

Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu

Martina Matoušková^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Antioxidant enzymes – biochemical markers of oxidative stress

Oxidative stress is the imbalance between the oxygen radicals and antioxidant defence system of the organism and leads to cell damage. Antioxidant enzymes are an important part of the defense against oxidative stress and the crucial ones are superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. Superoxide dismutase catalyses the conversion of superoxide to hydrogen peroxide, which can be further degraded by catalase to oxygen and water. Peroxidases are enzymes catalysing the reduction of the number of peroxides to alcohols. Glutathione peroxidases are selenium dependent enzymes using reduced glutathione (GSH) as a cofactor. They catalyze the conversion of hydrogen peroxide to water while the reduced glutathione is oxidized. The GSH is then being renewed by the activity of glutathione reductase, another antioxidative enzyme that reduces oxidized glutathione (GSSG) to GSH.

Přijato k publikování: 10. 8. 2014

Klíčová slova: antioxidační enzymy; glutathion peroxidáza; glutathion reductáza; kataláza; oxidační stres; superoxid dismutáza

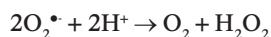
Úvod

Oxidační stres představuje nerovnováhu mezi kyslíkovými radikály a antioxidační obranou organismu a vede k poškození buněk. Antioxidační enzymy jsou důležitou součástí obrany vůči oxidačnímu stresu a mezi nedůležitější z nich patří superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza a glutathion reductáza.

Superoxid dismutáza (SOD)

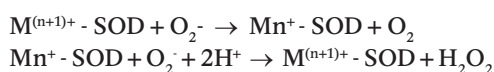
Formy SOD a mechanismus účinku

Jedním z hlavních antioxidačních enzymů je superoxid dismutáza – SOD, katalyzující přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který může být dále rozkládán katalázou. Superoxidový aniont má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se zároveň oxiduje i redukuje. Produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



Přestože ve vodném prostředí tahle reakce probíhá, v biologických systémech je ještě

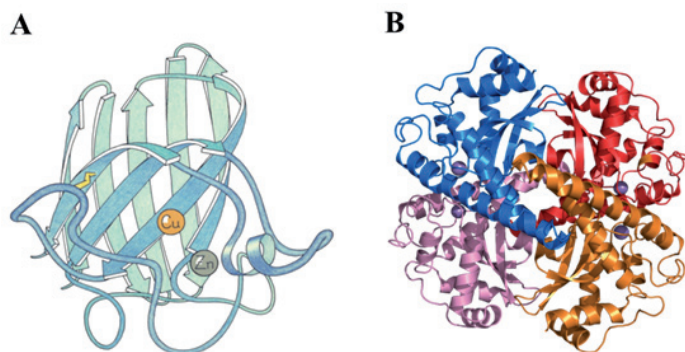
urychlována enzymem SOD¹, který katalyzuje proces přeměny superoxidu (O_2^{\bullet}) na peroxid vodíku (který je méně agresivní sloučenina) a kyslík podle následujících reakcí:



Kde $\text{M} = \text{Cu}$ ($n = 1$) anebo Mn ($n = 2$). U lidí (a jiných savců) existují tři formy SOD. SOD1 se nachází v cytoplazmě, SOD2 v mitochondriích a SOD3 v extracelulárním prostoru. SOD1 a SOD3 obsahují měď a zinek (**Obr. 1A**), zatímco SOD2 (**Obr. 1B**) obsahuje mangan. Superoxid dismutáza přispívá ke snížení oxidačního stresu a tím zabraňuje poškození DNA, RNA, proteinů a lipidů².

Metody stanovení SOD

Ke stanovení aktivity SOD se používají metody nepřímé, které jsou spojeny se schopností SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. Měření inhibice produkce superoxidů způsobené SOD slouží ke stanovení její aktivity⁵.



Obr.1: A) struktura podjednotky Cu-Zn SOD1 izolované z hovězích erytrocytů³ B) struktura lidské mitochondriální Mn SOD2⁴

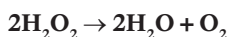
Metody se skládají ze tří kroků:

1. Produkce superoxidů: K produkci superoxidů se nejčastěji používá reakce xantinu s xantin oxygenázou, NADH (NADPH) s phenazin methosulfátem či jiné systémy.
2. Detekce superoxidů: Jako detektory superoxidů se nejčastěji používají nitrobluete-trazolium (NBT), cytochrom c, pyrogallol, 6-hydroxydopamin a další chromogenní substráty, které po reakci se superoxidy vytvářejí barevné produkty, jež jsou spektrofotometricky měřeny^{6,7}.
3. Inhibice reakcí řízených superoxidy: SOD mají schopnost reagovat se superoxidy, čímž dochází k inhibici přeměny chromogenních substrátů na jejich barevné produkty.

Kataláza

Mechanismus účinku

Enzym kataláza (EC 1.11.1.6., KAT) katalyzuje heterolytické štěpení dvou molekul peroxidu vodíku za vzniku kyslíku a vody⁸. Pro všechny dosud známé katalázy je společná základní reakce dismutace peroxidu vodíku podle reakčního schématu:



Kataláza je enzym schopný kromě redukce, i oxidace peroxidu vodíku, čímž se podstatně liší od peroxidáz (E.C. 1.11.1.5.), které dovedou

H_2O_2 pouze redukovat za současné oxidace sekundárního substrátu, kterým mohou být (pro buňky toxické) objemnější molekuly fenolických sloučenin⁹.

Kataláza se vyskytuje u téměř všech organismů s aerobním metabolismem. Její hlavní fyziologická role tkví v ochranné funkci buněk před mimořádně reaktivními molekulami s peroxidickou vazbou, které vznikají jako vedlejší produkty katabolismu. V buňkách eukaryotů je kataláza typic-

kým markerem subcelulárních organel, známých jako peroxisomy^{10,11}. Peroxisomy obsahují charakteristické anabolické systémy, jako například β -oxidační systém mastných kyselin. Účinkem peroxisomálních oxidáz vzniká značné množství peroxidu vodíku, který je odstraňován působením peroxisomální katalázy¹².

Katalázy a peroxidázy představují esenciální výbavu buněk při překonávání škodlivých účinků oxidačního stresu¹³. Podle novějších výzkumů katalázy účinkují u většiny pro- a eukaryotů v přímé součinnosti se superoxid dismutázami, které chrání před inaktivací vyššími koncentracemi peroxidu vodíku¹⁴.

Metoda stanovení katalázy

Metody stanovení katalázy jsou založeny na sledování rozkladu peroxidu vodíku působením kataláz. Tento rozklad je měřen jako pokles absorbance H_2O_2 při 240 nm. Většina sledovaných metod vychází z metody vyvinuté dle Aebi et al¹⁵. Metoda byla optimalizována pro jaterní tkáň modelových ptáků – křepelek japonských (*Coturnix japonica*) a savců – potkanů (*Rattus norvegicus var. alba*). Metoda je založena na schopnosti kataláz rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento rozklad je sledován měřením poklesu absorbance směsi vzorku s H_2O_2 v mikrokyvetách při 240 nm¹⁵.

Glutathion peroxidáza (GPx)

Formy GPx a mechanismus účinku

Intracelulární peroxidy vodíku (hydroperoxydy) jsou odstraňovány glutathionperoxidázou (GPx). Glutathion (GSH), je jedním z nejvýznamnějších činitelů antioxidačního obranného systému buňky, jelikož ve spojení s enzymy, glutathion peroxidázou (GPx) a glutathion-S-transferázou pí (GSTpi), hraje ústřední roli v detoxikaci a biotransformaci chemoterapeutických léčiv¹⁶.

Peroxidázy jsou enzymy katalyzující redukcí mnoha peroxidů na alkoholy. Glutathion peroxidázy jsou selen-dependentní cytosolové enzymy, používající GSH jako kofaktor. Katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na vodu a zároveň oxidaci redukovaného glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG). GPx hrají důležitou roli v ochraně membrán před jejich lipidovou peroxidací¹⁷ Produkty této reakce jsou příslušné alkoholy a voda:

GPx



V současné době jsou známy 4 různé glutathion peroxidázy: cytosolová (GPx-1), gastrointestinální (GPx-2), plasmatická (GPx-3) a fosfolipid hydroperoxidová (GPx-4)¹⁸. Všechny odstraňují peroxidy pomocí redukovaného glutathionu (GSH), a proto mají antioxidační funkci. Liší se svou lokalizací a substrátovou specifitou. Všechny GPx s výjimkou GPx-4 se skládají ze čtyř řetězců a v každém je jeden selenocystein¹⁹.

Metoda stanovení GPx

Aktivita glutathion peroxidázy (GPx) je stanovena na základě měření míry úbytku NADPH v čase reakcí využívající redukovaného glutathionu GSH jako substrátu. Ten je za účasti GPx přeměněn na GSSG. GSSG je okamžitě a nepřetržitě redukováno přebytkem aktivity glutathion reduktázy (GR), která tak zajišťuje konstantní hladinu GSH. GSSG za účasti GR reaguje s NADPH, čímž dochází k jeho úbytku a ten je měřen⁶. Metoda je modifikovaná na mikrodestičkové provedení a využívá spektrofotometrické koncovky při 340 nm.

Reakce je znázorněna v následujících rovnicích:

GPx



GR



Glutathion reduktáza (GR)

Mechanismus účinku

Glutathion peroxidáza (GPx) existuje ve dvou formách: selen-dependentní a selen-inderpendentní. Se-dependentní GPx katalyzuje oxidaci glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG) v přítomnosti H_2O_2 . Zpětnou redukcí GSSG na GSH zabezpečuje glutathion reduktáza (GR), která tak udržuje v buňkách fyziologický poměr GSH/GSSG (10:1).

Metoda stanovení GR

Glutathion reduktáza katalyzuje přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za spotřeby NADPH. Aktivita glutathion reduktázy je stanovována na základě úbytku množství NADPH v reakci. Metoda je modifikovaná na mikrodestičkové provedení a využívá spektrofotometrické koncovky při 340 nm²⁰.

GR



Závěr

V přehledovém článku byly popsány nejdůležitější antioxidační enzymy, jejich různé formy, místa a mechanismy jejich účinku a principy metod jejich stanovení.

Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1/072.3.00/20.0148.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Paoletti, F.; Aldinucci, D.; Mocali, A.; Caparrini, A. A SENSITIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF SUPEROXIDE-DISMUTASE ACTIVITY IN TISSUE-EXTRACTS. *Analytical Biochemistry*. 1986, 154, 536-541.
- Skalicka, Z.F.; Zolzer, F.; Beranek, L.; Racek, J. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 2012, 117, 111-114.
- Tainer, J.A.; Getzoff, E.D.; Beem, K.M.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. DETERMINATION AND ANALYSIS OF THE 2A STRUCTURE OF COPPER, ZINC SUPEROXIDE-DISMUTASE. *Journal of Molecular Biology*. 1982, 160, 181-217.
- Borgstahl, G.E.O.; Parge, H.E.; Hickey, M.J.; Johnson, M.J.; Boissinot, M.; Hallewell, R.A.; Lepock, J.R.; Cabelli, D.E.; Tainer, J.A. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*. 1996, 35, 4287-4297.
- Paoletti, F.; Mocali, A. DETERMINATION OF SUPEROXIDE-DISMUTASE ACTIVITY BY PURELY CHEMICAL-SYSTEM BASED ON NAD(P)H OXIDATION. *Methods in Enzymology*. 1990, 186, 209-220.
- Tarhan, L.; Tuzmen, M.N. Some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. *Turkish Journal of Chemistry*. 2000, 24, 109-116.
- Flohe, L.; Gunzler, W.A. ASSAYS OF GLUTATHIONE-PEROXIDASE. *Methods in Enzymology*. 1984, 105, 114-121.
- Chance, B. THE EFFECT OF PH UPON THE EQUILIBRIA OF CATALASE COMPOUNDS. *Journal of Biological Chemistry*. 1952, 194, 483-496.
- Barr, D.P.; Aust, S.D. ON THE MECHANISM OF PEROXIDASE-CATALYZED OXYGEN PRODUCTION. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993, 303, 377-382.
- Masters, C.; Crane, D. The peroxisome: A vital organelle, Cambridge University Press, The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge CB2 1RP, England; Cambridge University Press, 40 W. 20th Street, New York, New York 10011-4211, USA, 1995.
- McCammon, M.T.; Veenhuis, M.; Trapp, S.B.; Goodman, J.M. ASSOCIATION OF GLYOXYLATE AND BETA-OXIDATION ENZYMES WITH PEROXISOMES OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172, 5816-5827.
- Binder, M.; Schanz, M.; Hartig, A. VECTOR-MEDIATED OVEREXPRESSION OF CATALASE-A IN THE YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE INDUCES INCLUSION BODY FORMATION. *European Journal of Cell Biology*. 1991, 54, 305-312.
- Schellhorn, H.E. REGULATION OF HYDROPEROXIDASE (CATALASE) EXPRESSION IN ESCHERICHIA-COLI. *Fems Microbiology Letters*. 1995, 131, 113-119.
- Fridovich, I. SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASES. *Annual Review of Biochemistry*. 1995, 64, 97-112.
- Aebi, H. CATALASE INVITRO. *Methods in Enzymology*. 1984, 105, 121-126.
- Leonel, C.; Gelaleti, G.B.; Jardim, B.V.; Moschetta, M.G.; Regiani, V.R.; Oliveira, J.G.; Zuccari, D. Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors. *Bmc Veterinary Research*. 2014, 10.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003, 13, 57-149.
- Arthur, J.R.; Bermano, G.; Mitchell, J.H.; Hesketh, J.E. Regulation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism. *Biochemical Society Transactions*. 1996, 24, 384-388.
- Burk, R.F.; Hill, K.E.; Motley, A.K. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*. 2003, 133, 1517S-1520S.
- Carlberg, I.; Mannervik, B. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FLAVOENZYME GLUTATHIONE REDUCTASE FROM RAT-LIVER. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, 250, 5475-5480.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.