

ENZYMY A VOLNÉ RADIKÁLY

JAROSLAV RACEK a VÁCLAV HOLEČEK

Ustav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Fakultní nemocnice v Plzni, Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň, e-mail: racek@fnplzen.cz

Došlo dne 14.XII.1998

Klíčová slova: volné radikály, reaktivní formy kyslíku, NADPH-oxidasa, myeloperoidasa, nitrooxidsynthasa, xanthinoxidasa, superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa, katalasa

Volné radikály (VR) jsou atomy, molekuly či ionty schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nepárový elektron, ev. více nepárových elektronů. Snaží se proto získat další elektron a doplnit si tak elektronový pár do stabilní konfigurace. Z toho pramení jejich velká reaktivita a omezená doba existence. Reagují nejen s ostatními VR, ale i s intaktními molekulami a tím vytvářejí další volný radikál; tento děj má tendenci pokračovat formou řetězové reakce¹. VR mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy i bílkoviny včetně enzymů, což může vést k těžkému poškození tkání a celých orgánů.

Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku; dalšími přeměnami z nich mohou vznikat jiné reaktivní látky, které však již nemají nepárový elektron (peroxid vodíku, kyselina chlorná). Tyto látky se spolu s VR označují společným názvem reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) či dusíku (RSN).

Aerobní způsob života a získání energie nutně vedl k řešení vztahu organismů a VR. Organismy na jedné straně VR využívají ve svůj prospěch - k ničení fagocytovaných mikroorganismů, při ovulaci a oplodnění vajíčka, VR mají signální význam v buňce apod. Na druhé straně mohou VR organismus závažně poškodit a známe množství tzv. nemocí z VR, v jejichž etiopatogeneze či rozvoji komplikací hrají VR hlavní úlohu. Patří k nim např. ateroskleróza, diabetes mellitus, zhoubné novotvary, záněty aj.^{2,3} Proto organismus vyvinul účinné mechanismy obrany proti VR, obecně hovoříme o anti-oxidační ochraně.

Tvorba VR zahrnuje celou řadu neenzymových dějů (ionizující záření, exhalace z průmyslu, kouření aj.); stejně tak mnohé prostředky antioxidační ochrany mají neenzymový charakter (vitaminy C, E, β-karoten, bílkoviny a chelátotvorné látky vázající přechodné kovy aj.). Existuje však i množství dějů katalyzovaných enzymy, při nichž VR (resp. ROS) vznikají nebo jsou naopak odbourávány^{2,4,5}. Cílem tohoto sdělení je nejen popsat tyto enzymové děje, ale i ukázat jejich vzájemné souvislosti a souhrn, která je nutná pro zachování příznivého účinku VR a zároveň k vyloučení jejich účinku škodlivého.

Enzymy spojené s metabolismem VR (ROS) můžeme dělit z hlediska toho, zda se uplatňují při tvorbě ROS, jejich zániku či vzájemných přeměnách. Konečně existují i enzymy, mající

k metabolismu ROS vztah nepřímý. Zástupce některých enzymů z uvedených skupin ukazuje tabulka I. Další text si pak podrobněji všímá nejdůležitějších z nich.

Enzymy podílející se na tvorbě ROS

NADPH-oxidasa

Tento enzym vedle NO-synthasy patří k hlavním enzymům, katalyzujícím vznik volných radikálů v buňkách. Jak bude z dalšího patrné, je jejich přítomnost v určitém typu buněk nezbytná a jimi katalyzovaný vznik VR má nezastupitelnou úlohu v celé řadě buněčných funkcí; na druhé straně, je-li produkce VR nadměrná a není-li vyvážena odpovídající hladinou antioxidantů, může dojít k poškození buněk a celého organismu.

NADPH-oxidasa katalyzuje vznik superoxidu jednoelektronovou redukcí kyslíku:



Enzym je obsažen zejména ve fagocytech. Nejvyšší aktivitu vykazují neutrofilní granulocyty (polymorfonukleáry), nachází se i v monocytech, tkáňových makrofágách, jako jsou Kupfferovy buňky jater či mikroglie v mozku⁶, a dokonce i v některých nefagocytujících buňkách, jako jsou B-lymfocyty aj. Jsou-li fagocyty v klidu, je enzym neaktivní; k hlavním stimulatorům jeho aktivity patří fagocytóza jakotaková a dále řada cytokinů, zejména tzv. tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ), aktivovaná složka komplementu 5a aj.^{7,8}

Jak již bylo uvedeno, superoxidový radikál je nezbytný pro správnou funkci fagocytujících buněk - zabíjení fagocytovaných bakterií a jiných mikroorganismů. Protože však superoxid samotný je málo účinný, je ve fagocytech dále přeměňován na účinnější metabolity:

- reakcí katalyzovanou superoxiddismutasou vzniká peroxid vodíku,
- reakcí peroxidu vodíku s chloridovými ionty vzniká kyselina chlorná; reakci katalyzuje myeloperoidasa,
- kyselina chlorná může reakcí se superoxidem či Fe^{2+} poskytnout hydroxylový radikál,
- hydroxylový radikál může vzniknout i reakcí peroxidu vodíku s přechodnými kovy (Fentonova reakce),
- superoxid s oxidem dusnatým reaguje na peroxynitril, který může štěpením poskytnout velmi reaktivní radikály oxidu dusičitého a hydroxylový.

Aktivita NADPH-oxidasy v B-lymfocytech je řádově nižší než aktivita stejného enzymu v polymorfonukleárech. Na aktivaci tohoto enzymu se zde podílí vazba protilátek na povrchové antigeny, zejména antigeny třídy HLA-DR. Význam NADPH-oxidasy v B-lymfocytech není dosud jasný. Stejně tomu je i v jiných buňkách; uvažuje se o tom, že její přítomnost v buňkách karotického sinu může sloužit jakožto „kyslíkový senzor“, stojící na počátku neurohumorální reakce organismu na hypoxii⁹. NADPH-oxidasa je obsažena i v rostlinné tkáni a i zde má její katalyzovaná produkce superoxidu

Tabulka I

Příklady a funkce některých enzymů ve vztahu k reaktivním formám kyslíku (ROS)

Enzym	Produkují ROS	Spotřebovává ROS	Poznámka
<i>I. Enzymy tvořící ROS</i>			
NADPH-oxidasa	O_2^-	-	aktivována při fagocytóze
Xanthinoxidasa	H_2O_2 , O_2^-	-	po přeměně z xanthindehydrogenasy
Cyklooxygenasa	O_2^-	-	tvorba prostaglandinů
5- a 12-lipoxygenasa	O_2^-	-	tvorba leukotrienů
Enzymy terminálních oxidací	$HO_2^\bullet$	-	při velmi nízkém či vysokém pO_2
Různé oxidasy (glukosaoxidasa, laktát oxidasa aj.)	H_2O_2	-	obsaženy v mikrobiálních buňkách
Urikasa	H_2O_2	-	chybí u člověka a primátů
Nitroxidsynthasa	$NO^\bullet$	-	-
<i>II. Enzymy přeměňující jednu reaktivní formu kyslíku na jinou</i>			
Superoxiddismutasa	H_2O_2	or	základní antioxidační enzym
Myeloperoxidasa	$HOCl$	O_2^-	význam pro usmrcení fagocytovaných mikroorganismů
<i>III. Enzymy odstraňující ROS</i>			
Katalasa	-	H_2O_2	uvolňuje se kyslík
Peroxidasy (např. glutathionperoxidasa, askorbátperoxidasa, nespecifické peroxidasy)	-	H_2O_2	uvolněný kyslík oxiduje kosubstrát
<i>IV. Ostatní enzymy</i>			
Glutathionreduktasa	-	-	regeneruje GSH a umožňuje tak funkci glutathionperoxidasy; vyžaduje NADPH
Dehydroaskorbátreduktasa	-	-	regenerace askorbátu
Paraoxonasa	-	-	brání oxidaci LDL (asi štěpením jejich hydroperoxidů)

obrný charakter. Enzym se aktivuje po napadení rostliny plísními, hlísty a jinými parazity.

NADPH-oxidasa se skládá ze čtyř podjednotek. Dvě z nich jsou lokalizovány v membráně lyzozomů: glykoprotein gp91 a polypeptid p22. V cytoplazmě jsou pak další dvě peptidické složky, p47 a p67 (čísla znamenají molární hmotnost v tisících). Vlastní katalyticky účinnou část tvoří dvě membránové podjednotky, nazývané dohromady cytochrom₅₅₈, zřejmě na základě alosterického efektu¹⁰.

Pro dostatečnou aktivaci NADPH-oxidasy je však třeba nekovalentní vazba tří dalších proteinů, příbuzných proto-onkogenům *ras*, a to cytoplazmatických *Rac1* a *Rac2* a membránového *Rap1A*.

Defekt tvorby může být následkem mutace kterékoliv ze čtyř podjednotek, tvořících enzym. Ve dvou třetinách případů je postižena podjednotka gp91; její gen je vázán na X-chromosom^{12,13}. Defekty ostatních tří podjednotek se dědí autosomálně recesivně. Klinickým výrazem je závažné onemocnění – chronická granulomatóza¹⁴. Neschopnost fagocytů tvořit superoxid se projevuje opakovanými závažnými infekcemi bakteriálními a mykotickými; přes léčbu antibiotiky umírají nemocní v sepsi obvykle mezi 30.–40. rokem věku.

Zvýšení aktivity se pozoruje u sepse, akutního syndromu dechové tísně (ARDS), revmatických onemocnění a jiných závažných zánětlivých chorob.

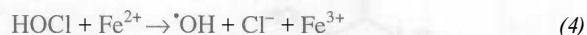
Myeloperoxidasa (MPx), EC 1.11.1.7

Tento enzym katalyzuje reakci peroxidu vodíku s chloridovými ionty; vzniká látka s mohutným oxidačním účinkem

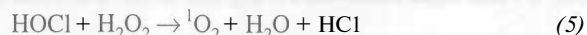
- kyselina chlorná HOCl:



MPx je obsažena v azurofilních granulech neutrofilních granulocytů¹⁵ a v lyzosomech monocytů¹⁶. Uplatňuje se při fagocytóze jako látka schopná zabít bakterie, plísně, parazity a tumorové buňky. Může dát vzniknout ještě reaktivnějšímu hydroxylovému radikálu¹⁷:



V reakci HOCl s peroxidem vodíku může vzniknout i nebezpečný singletový kyslík, představující další aktivní formu kyslíku:



Při nadměrné tvorbě HOCl dochází k chloraci bílkovin (vznikají chloraminy) včetně enzymů energetického metabolismu (akonitasa), syntézy cholesterolu a metabolismu VR (superoxiddismutasa). Hydroxylový radikál může zahájit proces lipoperoxidace.

MPx je tetramer o celkové molekulové hmotnosti 150 kD, obsahující dva těžké řetězce (každý o molekulové hmotnosti 60 kD) a dva řetězce lehké (po 15 kD). Každý z řetězců váže jednu molekulu hemu¹⁸.

Hereditární deficit myeloperoxidasy je autosomálně rece-

sivní onemocnění s mírným průběhem; jen někteří postižení mají zvýšenou náchylnost k infekci.

NO-synthasa (NOS), L-arginin, NADPH: kyslík - oxidoreduktasa, EC 1.14.13.39

Oxid dusnatý (NO, NO') hraje nezastupitelnou roli v regulaci mnohých buněčných funkcí (viz níže). Vzniká při přeměně argininu na *citrullin*, v reakci katalyzované *nitroxidsynthasou* (NOS).

Reakce probíhá dvoustupňově. V první fázi dochází k hydroxylaci jednoho z guanidinových dusíků L-argininu; vzniká tak N-hydroxy-L-arginin. Při této reakci je spotřebována jedna molekula NADPH a jedna molekula kyslíku¹⁹. Druhým krokem je pak tříelektronová oxidace tohoto intermediátu. Uvolňuje se při ní oxid dusnatý a L-citrullin za spotřeby jedné molekuly kyslíku a 0,5 molekuly NADPH (obr. 1).

Tuto druhou část reakce však kromě NOS může katalyzovat i cytochrom P₄₅₀. Odštěpení oxidu dusnatého z N-hydroxy-L-argininu může dokonce probíhat i bez účasti enzymů, a to vlivem superoxidu - buď přímo nebo po hydrolyze na hydroxylamin (obr. 2). Tyto reakce umožňují vznik NO i ve tkáních, neobsahujících NOS. Potvrzením této možnosti je výrazný pokles produkce NO vlivem superoxidodismutasy, která odstraňuje potřebný superoxid²⁰.

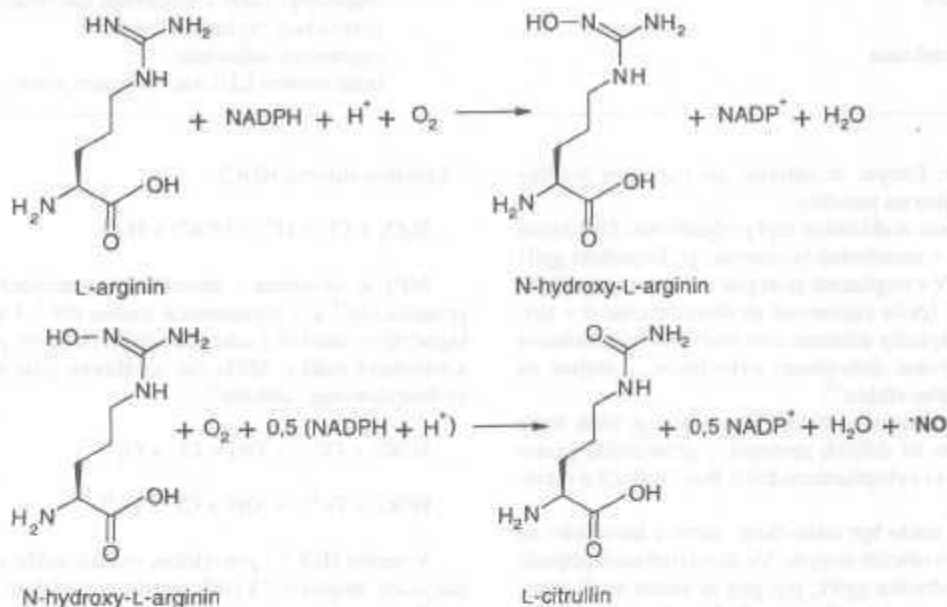
NO-synthasa je dimerický enzym, obsahující dvě identic-

ké podjednotky o molární hmotnosti 130-150 kDa, které vážou čtyři různé prostetické skupiny: flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), tetrahydrobiopterin (BH₄) a hem. Každá z podjednotek má dvě domény: reduksovou, jejíž sekvence aminokyselin je velmi podobná sekvenci cytochromu P₄₅₀ a oxygenasovou, která obsahuje hem²¹.

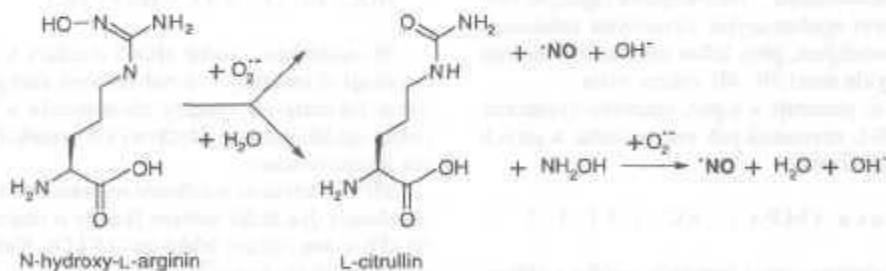
Nitroxidsynthasa je schopna redukovat kyslík prostřednictvím NADPH i za nepřítomnosti hlavního substrátu - argininu. Výsledkem jejího katalytického působení je pak superoxid²² nebo peroxid vodíku²³.

Rozlišujeme v podstatě dva typy NOS:

- konstitutivní (cNOS), jejíž aktivita je závislá na přítomnosti Ca²⁺ a kalmodulinu. Vyskytuje se v endoteliích, nadledvinách, mozku, trombocytech, polymorfonukleárních leukocytech, fibroblastech, retině a v některých nervových zakončeních²¹,
- inducibilní (iNOS); její aktivita nezávisí na vazbě Ca²⁺ a kalmodulinu²⁴, ale syntéza je stimulována některými cytokiny, jako je interferon-γ (IFN-γ), tumor necrosis factor-α (TNF-α) a interleukin-1 (IL-1), a navíc lipopolysacharidem endotoxinem. Po úplné indukci je její aktivita v buňkách až o několik řádů vyšší než aktivita cNOS. Inducibilní NOS tvoří endotelie, makrofágy, polymorfonukleární leukocyty, fibroblasty, žírné buňky, hepatocyty a další buňky²¹.



Obr. 1. Vznik oxidu dusnatého z L-argininu účinkem nitroxidsynthasy



Obr. 2. Alternativní vznik oxidu dusnatého z N-hydroxy-L-argininu ve tkáních neobsahujících nitroxidsynthasu

Gen pro iNOS je lokalizován na 17. chromosomu²⁵, zatímco tvorba cNOS je řízena dvěma geny, které jsou umístěny na 7. a 12. chromosomu. Podle toho rozlišujeme dva typy konstitutivní NOS: endoteliální, eNOS (26) a neuronální, nNOS (27), které jsou však obsaženy i v jiných buňkách, než napovídá jejich název.

Produkt katalytického působení NOS, oxid dusnatý, má v organismu řadu důležitých funkcí; k nejdůležitějším patří vazodilatace, působí i jako neurotransmiter a má protizánětlivý účinek.

Nesmírně zajímavý je vztah oxidu dusnatého a superoxidu, které do určité míry působí antagonisticky. Tak např. NO[•] je známý svým vazodilatačním působením (odpovídá vazodilatační substanci zvané endothelium-derived relaxing factor, EDRF), zatímco O₂^{•-} má účinek vazokonstrikční. Přitom některé typy buněk jsou schopné produkovat obě tyto látky. Pro jejich rovnováhu je důležitá nejen citlivá regulace tvorby pomocí cytokinů i jinými vlivy (viz výše), ale i fakt, že NO[•] a O₂^{•-} spolu vzájemně reagují za vzniku peroxynitritu. Ten je sám toxický a může oxidovat methionin a thiolové skupiny bílkovin. Jeho další osud je dvojitý: může se štěpit na další reaktivní radikály či ionty nebo dojde k intramolekulárnímu přesmyku a vzniká poměrně málo škodlivá kyselina dusičná:



Xanthinoxidasa (XO), xanthin : O₂ oxidoreduktasa, EC 1.2.3.2

Xanthinoxidasa je enzym podílející se na konečných reakcích katabolismu purinů: oxiduje hypoxanthin na xanthin a ten pak na kyselinu močovou.



Enzym není příliš specifický; kromě purinových látek katalyzuje i oxidaci některých aldehydů (např. acetaldehydu či benzaldehydu) na příslušné kyseliny. Předpokládá se však, že fyziologická úloha enzymu je v katabolismu purinů²⁸. Nejvyšší aktivita XO se nachází v hepatocytech. XO ze střevní sliznice má ve své molekule místo molybdenu měď.

Chemicky se jedná o flavoprotein (obsahuje FAD), složený ze dvou identických podjednotek o molekulové hmotnosti asi 150 kDa; součástí molekuly enzymu je i molybden a železo vázané v blízkosti -SH skupin. Intramolekulární transport elektronů probíhá normálně od atomu molybdenu k FAD; na elektronovém přenosu mezi těmito centry se podílí železo se skupinami -SH (cit.²⁹).

Akceptorem elektronů je molekula kyslíku. Jsou v podstatě možné dva průběhy reakce:

1. dvouvalentní proud elektronů, při kterém vzniká peroxid vodíku; uplatňuje se zde přenos elektronů na kyslík z flavinu ve formě hydrochinonu,
2. jednoelektronová redukce kyslíku, dávající vzniknout superoxidu (O₂^{•-}), kdy je kyslík redukován flavinem ve formě semichinonu.

Poměr těchto dvou typů se mění v závislosti na řadě faktorů, k nimž patří mj. druh substrátu, koncentrace substrá-

tu a produktu (kyseliny močové), parciální tlak kyslíku a pH.

Za určitých okolností též enzym funguje jako xanthindehydrogenasa (XD). Místo molekuly obsahující cysteiny je totiž schopno vázat NAD⁺. V tomto případě nevznikají při reakci žádné reaktivní formy kyslíku. Je-li změněna struktura vazebného místa např. účinkem tepla, proteas apod., jsou elektrony místo na NAD⁺ přenášeny přímo na kyslík a xanthindehydrogenasa se tak mění na xanthinoxidasu. K tomu dochází např. v procesu reperfuze následující po přechodné ischemii, jak je tomu při fibrinolytické léčbě infarktu myokardu, u rekonstrukčních operací cévních okluzí, po transplantaci orgánů, v kloubu nemocných revmatoidní artritidou apod.³⁰ Reakce katalyzovaná xanthinoxidasou je v těchto případech jedním ze zdrojů ROS; puriny z poškozené tkáně jsou substrátem enzymu. Další příčinou přeměny XD na XO může být adheze aktivovaných neutrofilů na buňky při zánětu³¹.

Je zajímavé, že zde reakce produkující ROS (peroxid vodíku či superoxid) zároveň dává vzniknout látce s významným antioxidačním účinkem - kyselině močové, která je u člověka konečným metabolitem purinů.

Nejznámějším inhibítozem XO je allopurinol. Užívá se k léčbě hyperurikémie, má však i významné antioxidační účinky.

Dědičný deficit tvorby XO se projevuje hromaděním prekurzorů a xanthinurií se sklonem k tvorbě xanthinových močových konkrementů.

Hlavní enzymy antioxidační ochrany

Superoxiddismutasa (SOD), superoxid : superoxid oxidoreduktasa, EC 1.15.1.1

Superoxid (O₂^{•-}) vzniká jedoelektronovou redukcí kyslíku. Je to asi nejčastěji se objevující radikál v organismech^{32,33}. Vzniká při autooxidaci flavinů, hydrochinonů, catecholaminů, thiolů, tetrahydropterinů a hemoproteinů. Tvoří se při mnohých enzymových reakcích - např. katalytickým účinkem xanthinoxidas a řady jiných oxidas, lipoxigenas, cyklooxygenas, při přenosu elektronů v dýchacím řetězci a při fotosyntéze v chloroplastech. Fagocytující buňky, ale i některé rostlinné tkáně ho vytvářejí působením NADPH-oxidasy. Superoxid sám není příliš reaktivní a tedy ani škodlivý. Spontánně se tzv. dismutací přeměňuje na peroxid vodíku. Nebezpečí superoxidu tkví v tom, že z něj mohou vznikat další, mnohem škodlivější reaktivní formy kyslíku - mimo již zmíněný peroxid vodíku i hydroxylový radikál, peroxynitrit či kyselina chlorná. Proto se organismy orientovaly na „prevenci“ s cílem odstranit přebytečný superoxid a tak zabránit vzniku hydroxylového radikálu. Enzym superoxiddismutasa (SOD) urychluje dismutaci superoxidu o 4 řády:



Je samozřejmé, že i vzniklý peroxid vodíku musí být účinně odstraňován; zde se uplatňují navazující reakce katalyzované katalasou a peroxidasami (viz tyto enzymy).

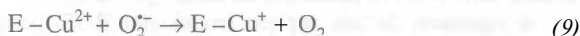
Superoxiddismutasa je obsažena (až na zanedbatelné výjimky) ve všech aerobních organismech. Rozenzáváme tři druhy SOD, lišící se kofaktorem; tím je vždy atom kovu, hrající roli v katalytickém účinku enzymu³⁴.

1. Mn²⁺SOD a Fe²⁺SOD mají podjednotky o molekulové

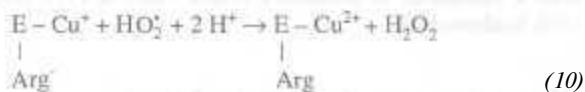
hmotnosti 23 kDa. FeSOD se vyskytuje v dimerické formě, MnSOD existuje jako dimer i jako tetramer. Každá z podjednotek váže jeden kovový atom. Oba enzymy mají podobnou strukturu a jejich bílkovinná část vykazuje aktivitu s kterýmkoliv z obou iontů. Všechna prokaryota obsahují MnSOD a/nebo FeSOD. Oba z těchto enzymů najdeme i v prokaryotických řasách a protozoích.

2. $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}\text{SOD}$ - je enzym dimerické struktury o celkové molekulové hmotnosti 32 kDa, zcela odlišné struktury než Mn či FeSOD. Každá z podjednotek obsahuje po jednom atomu obou kovů; měď slouží jako redoxní centrum, zinek má strukturní úlohu.

Vlastní reakční mechanismus je následující³⁵: Ion Cu^{2+} v molekule enzymu je redukován prvou molekulou superoxidu na Cu^+ :



Další molekula superoxidu je pak v protonizované formě (proton získá z argininu v blízkosti aktivního centra) jakožto hydroperoxylový radikál schopna znovu oxidovat Cu^+ a tak regenerovat původní formu enzymu; v této druhé reakci se tvoří molekula peroxidu vodíku:



Bylo zjištěno, že obdobný je reakční mechanismus i u MnSOD a FeSOD³⁶.

Cu/ZnSOD se vyvinula ve fylogeneze později a nachází se v buňkách vyšších eukaryotických organismů -jak rostlin, tak živočichů. U člověka ho najdeme např. v hepatocytech, mozku a erytrocytech, a to v cytoplasmě. Výjimečně se najde i v některých bakteriálních kmenech; uvažuje se o možném přenosu genu z hostitele do bakteriální buňky³⁷.

Vyšší eukaryota obsahují navíc i MnSOD, která je lokalizo-

vána v mitochondriích. Jedná se tedy vlastně o dvě zcela odlišné molekuly se stejnou katalytickou funkcí, které se uplatňují v různých buněčných kompartmentech³⁸. Rostliny obsahují navíc SOD i v chloroplastech; jedná se o typ Cu/ZnSOD ³⁸.

Oxidativní stres, doprovázený tvorbou superoxidu, vyvolává indukci syntézy SOD u mikroorganismů, vyšších živočichů i rostlin³⁴; záleží přitom na subcelulární lokalizaci produkce VR, který typ SOD reaguje zvýšenou syntézou.

Jednotlivé typy SOD se dají odlišit i rozdílnou citlivostí k inhibitorům.

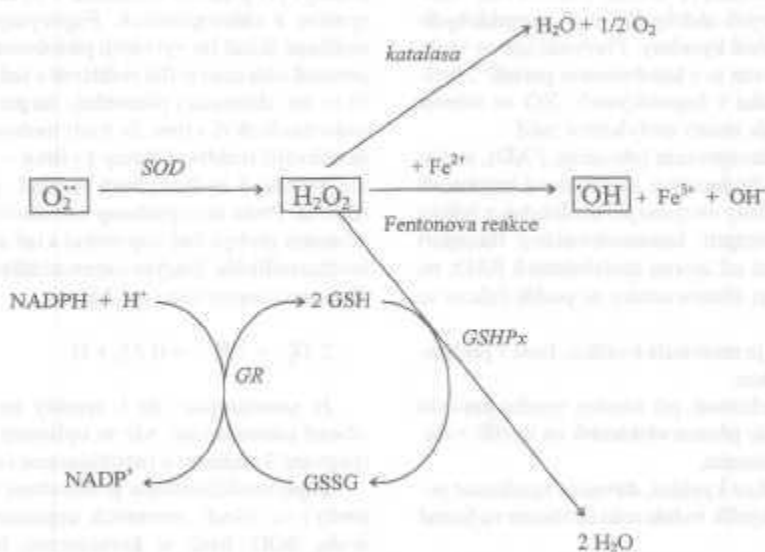
Chybění aktivity SOD má pro postižený organismus závažné následky; to svědčí o významu tohoto enzymu. Mutanty bakterií *Escherichia coli*³⁹ a kvasinek⁴⁰ jeví zvýšenou citlivost ke kyslíku. U člověka vede deficit Cu/ZnSOD k těžkému postižení motorických neuronů v mozkové kůře a míše. Onemocnění se dědí autosomálně dominantně a je známo pod názvem amyotrofická laterální skleróza⁴¹.

Snížená aktivita SOD u některých onemocnění může vést následkem nedostatečného odstraňování superoxidu k poškození organismu působením ROS. Nižší aktivita SOD byla popsána např. u některých hemodialyzovaných nemocných; může se na ní podílet např. inhibice enzymu hliníkem⁴².

Zvýšená aktivita Cu/ZnSOD ve tkáních doprovází četná tzv. onemocnění z volných radikálů. Zvýšená tvorba superoxidu vede totiž ke stimulaci syntézy enzymu. Tak je tomu např. u nemocných se sklerotickým postižením cév, revmatoidní artritidou⁴³, Alzheimerovou chorobou⁴⁴, u diabetiků, nemocných s hyperlipoproteinémií⁴⁵ aj. MnSOD stoupá v séru pacientů po infarktu myokardu⁴⁶. Její zvýšení v séru alkoholiků svědčí o oxidativním stresu u těchto osob⁴⁷.

Superoxiddismutasa se může podat i jako léčebný přípravek. Její intraartikulární aplikace u nemocných s revmatoidní artritidou snižuje zánětlivé projevy v kloubu, vyvolané nadprodukcí superoxidu. Intravenózní podání SOD příjemci transplantované ledviny vedlo ke snížení reperfučního poškození transplantovaného orgánu a k jeho lepší funkci⁴⁸.

Gen řídící tvorbu Cu/ZnSOD se nachází na 21. chromoso-



Obr. 3. Vzájemná souvislost hlavních antioxidačních enzymů. SOD = superoxiddismutasa, GSHPx = glutathionperoxidasa, GR = glutathionreduktasa

mu. Potvrdil se předpoklad, že u nemocných s trisomií 21. chromosomu (Downův syndrom) bude aktivita SOD v erythrocytech asi o 50 % vyšší než u zdravých osob. Byl popsán průkaz zvýšené aktivity SOD v erythrocytech plodu získaných punkcí umbilikální vény k potvrzení diagnózy Downova syndromu⁴⁹. Analogicky se poloviční aktivita enzymu nachází u dětí s monosomií 21. chromosomu; onemocnění je doprovázeno poruchami vývoje skeletu a srdečními vadami⁵⁰.

Rada pokusů byla učiněna za účelem zvýšení aktivity Cu/ZnSOD a MnSOD ve tkáních rostlin pomocí genetického inženýrství (přenesením genu SOD z příbuzné rostliny) nebo selekcí jedinců se zvýšenou aktivitou enzymu⁵¹. Předpokládalo se, že takto pozměněné rostliny budou vitálnější, s vyšší odolností k oxidativnímu stresu a mj. i k herbicidu paraquat, který působí poškození organismů právě zvýšenou tvorbou superoxidu. Tento předpoklad se však potvrdil jen v některých případech.

Glutathionperoxidasa (GSHPx, GPx),
glutathion : peroxid vodíku
oxidoreduktasa, EC 1.11.1.9

Jak bylo uvedeno v předchozích odstavcích, superoxidu se organismus zbavuje dismutací v reakci katalyzované superoxidodismutase. K odstraňování vzniklého peroxidu vodíku se vyvinuly dva systémy⁵¹:

- katalasa, která štěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík (viz další kapitola),
- peroxidasy, které rovněž redukují peroxid vodíku, současně se však oxiduje jiný substrát:



Peroxidas je v živočišné i rostlinné říši více druhů. Některé z nich jsou nespecifické a oxidují více různých substrátů (donor: H_2O_2 oxidoreduktasa, EC 1.11.1.7), jiné potřebují specificky jen určitý substrát. U živočichů - a tedy i u člověka - je to glutathionperoxidasa, kde dochází k oxidaci glutathionu, u rostlin je nejčastější askorbatperoxidasa využívající kyselinu askorbovou.

Glutathionperoxidasa je enzym katalyzující štěpení peroxidu vodíku a současnou oxidaci cystein obsahujícího glutathionu (GSH):



Aby tento enzym mohl plynule zajišťovat likvidaci peroxidu vodíku, je třeba regenerovat glutathion v redukované formě. K tomu slouží enzym glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2), který využívá k redukcí glutathionu pyridinový koenzym NADPH:



Výsledkem obou těchto reakcí je tedy rozštěpení peroxidu a současná oxidace NADPH:



GSHPx se vyskytuje ve třech různých formách, které se nacházejí v různých oddílech buňky. Dají se odlišit např. imunochemicky.

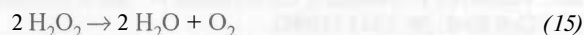
Prvé dvě formy se nacházejí v cytoplazmě buněk (cGSHPx) a v krevní plazmě, tedy v extracelulární tekutině (eGSHPx)⁵². Jedná se o bílkovinu o molekulové hmotnosti 22 kDa, obsahující v aktivním centru speciální aminokyselinu, selenocystein (selenový analog cysteinu). Je zajímavé, že tato aminokyselina má svou speciální tRNA; někdy je také nazývána „21. aminokyselinou“⁵³.

Třetí typ GSHPx se od předchozích liší. Je vázaná v membráně a odtud i název fosfolipidová glutathionperoxidasa (pGSHPx). Tento enzym o molekulové hmotnosti 18 kDa redukuje nejen peroxid vodíku, ale na rozdíl od předchozích dvou typů GSHPx i lipidové hydroperoxidy, které přeměňuje na příslušné hydroxylové deriváty lipidů. Tím chrání fosfolipidy buněčných membrán a přerušuje řetězovou reakci poškození lipidů volnými radikály (lipoperoxidaci).

Dědičný defekt tvorby GSHPx se projeví stejně jako defekt tvorby GR – činnost obou enzymů je spřažená⁵⁴. Výsledkem je poškození buněčných membrán, které nejsou chráněny před lipoperoxidací, což má za následek mírnou až středně těžkou hemolytickou anémií. K méně výraznému poklesu aktivity GSHPx dochází i při nedostatku selenu.

Katalasa (CAT), H_2O_2 : H_2O_2
oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6

Katalasa je enzym, zajišťující štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík:



Působí přitom na peroxid vodíku ve vysokých koncentracích. Tím se liší od peroxidas, kde kromě peroxidu vodíku je ještě další kosubstrát, který je v reakci oxidován. Peroxidasy navíc působí na nízké koncentrace peroxidu vodíku ev. jiných hydroperoxidů.

Katalasa je tetramerní hemoprotein o molekulové hmotnosti 240 kDa, obsahující dále 4 molekuly NADPH. V lidském organismu nacházíme nejvyšší aktivitu v mitochondriích a peroxisomech hepatocytů a v cytoplazmě erytrocytů. U jiných živočišných druhů může být distribuce katalasy ve tkáních odlišná; tak např. erytrocyty kachny katalasu prakticky neobsahují⁵⁵. Význam pro organismus je jasný: chrání uvedené buňky před toxickým vlivem vyšší koncentrace peroxidu vodíku. Navazuje tak vlastně (spolu s peroxidasami) na činnost superoxidodismutasy (obr. 3). V případě, že vazebné místo enzymu pro NADPH je obsazeno, přeměňuje katalasa i peroxid vodíku v nízkých koncentracích⁵⁶.

Dědičný deficit katalasy je velmi vzácný a navíc není doprovázen závažnými klinickými příznaky. Švýcarský typ je zcela asymptomatický, japonský typ se projevuje tvorbou ulcerací v ústní dutině⁵⁷.

Práce vznikla za podpory grantu IGA Ministerstva zdravotnictví ČR č. 4002-3.

LITERATURA

- Gutteridge J. M. C: Clin. Chem. 41, 1819 (1995).
- Sies J.: Eur. J. Biochem. 215, 213 (1993).
- Racek J., Holeček V.: Klin. Biochem. Metab. 2, 94 (1994).
- Racek J., Holeček V.: Klin. Biochem. Metab. 2, 137 (1994).
- Đuračková Z.: Klin. Biochem. Metab. 5, 194 (1997).

6. Sankarapandi S., Zweier J. L., Mukherjee G., Quinn M. T., Huso D. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 353, 312 (1998).
7. Maly F. E., Schürer-Maly, C. C.: *NIPS* 10, 233 (1995).
8. DeLeo F. R., Renee J., McCormick S., Nakamura M., Apicella M., Weiss J. P., Nauseef W. M.: *J. Clin. Invest.* 707, 455 (1998).
9. Youngson C., Nurse C., Yeager H., Cutz E.: *Nature* 365, 153 (1993).
10. Imajok-Ohmi S., Tokita K., Ochiai H., Nakamura M., Kanegasaki S.: *Biol. Chem.* 267, 180 (1992).
11. Gabig T. G., Crean C. D., Martel P. L., Rosli R.: *Blood* 85, 804 (1995).
12. Rae J., Newburger P. E., Dinauer M. C., Noack D., Hopkins P. J., Kuruto R., Curnutte J. T.: *Am. J. Human Gen.* 62, 1320 (1998).
13. Dinauer M. C., Orkin S. H., Brown R., Jesaitis A. J., Parkos C. A.: *Nature* 327, 717 (1987).
14. Dinauer M. C.: *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci* 30, 329 (1993).
15. Kebanoff S. J., v knize: *The Reticuloendothelial System* (Sbarra A. J., Strauss R. R., ed.), sv. 2, str. 279, New York, Plenum Press 1980,
16. Bos A., Wever R., Ross D.: *Biochim. Biophys. Acta* 525, 37 (1978).
17. Candeias L. P., Patel K. B., Stratford M. R. L., Wardman P.: *FEBS Lett.* 333, 151 (1993).
18. Koeffler H. P., Ravyard J., Pertecheek M.: *Blood* 65, 484 (1985).
19. Lanza F.: *J. Mol. Med.* 76, 676 (1998).
20. Vetrovsky P., Stoclet J. C., Entlicher G.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1311 (1996).
21. Farrel A. J., Blake D. R.: *Ann. Rheum. Dis.* 55, 7 (1996).
22. Pou S., Pou W. S., Bredt D. S., Snyder S. H., Rosen G. M.: *J. Biol. Chem.* 267, 24173 (1992).
23. Heinzl B., John M., Klatt P., Bohme E., Mayer B.: *Biochem. J.* 281, 627 (1992).
24. Cho H. I., Xie Q. W., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D., Nathan C.: *J. Exp. Med.* 776, 599 (1992).
25. Marsden P. A., Heng H. H. Q., Duff C., Shi X. M., Tsui L. C., Hall A. V.: *Genomics* 19, 183 (1994).
26. Marsden P. A., Heng H. H. Q., Scherer, S. W.: *J. Biol. Chem.* 268, 17478 (1993).
27. Spurr N., Liao M., Lizhi L., Emmson P., Weiming X.: *Genomics* 14, 802 (1992).
28. Fried R., Fried L. W., v knize: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmayer H. U., ed.), sv. 2, str. 673. Verlag Chemie, Academic Press, New York 1974
29. Sumi S., Wada Y.: *Nippon Rinsho* 54, 3226 (1996).
30. Nishino T.: *J. Biochem. (Tokyo)* 116, 1 (1994).
31. Wakabayashi Y., Fujita H., Morita J., Kawaguchi H., Murota S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1265, 103 (1995).
32. Bowler C., Van Montagu M., Inzé D.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43, 83 (1992).
33. Elstner E.: *Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin.* B. I. Wissenschaftsverlag, Mannheim 1990.
34. Bannister J. V., Bannister W. H., Rotilio G.: *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 111 (1987).
35. Fielden E. M., Roberts P. B., Bray R. C., Lowe D. I., Mautner G. N., Rotilio G., Calabrese L.: *Biochem. J.* 139, 499 (1974).
36. Lavelle F., McAdam M. E., Fielden M. E., Roberts P. B., Puget K., Michelson A. M.: *Biochem. J.* 161, 3, 1977.
37. Bannister J. V., Parker M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 149 (1985).
38. Bray R. C., Cockle, S. A., Fielden E. M., Roberts P. B., Rotilio G., Calabrese L.: *Biochem. J.* 139, 43 (1974).
39. Carlzio A., Tonati D.: *EMBO J.* 5, 623 (1986).
40. van Loon, A. P. G. M., Pesold-Hurt B., Schatz G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3820 (1986).
41. Hosler B. A., Brown R. H. Jr.: *Adv. Neurol.* 68, 41 (1995).
42. Hasanoglu E., Altan N., Sindel S., Ongun C. O., Bali M., Altintass E.: *Gen. Pharm.* 25, 107 (1994).
43. Kučera M., Racek J., Holeček V.: *Vnitr. Lek.* 42, 320 (1996).
44. deLustig E. S., Serra J. A., Kohan S., Canziani, G. A., Famlari A. L., Dominquez R. O.: *J. Neurol. Sci* 115, 18 (1993).
45. Steinerová A., Racek J., Holeček V.: *Diagnóza* 2, 79 (1996).
46. Usui A., Kato K., Tsuboi H., Sone T., Sassa H., Abe T.: *Clin. Chem.* 37, 458 (1991).
47. Thome J., Foley P., Gsell W., Davids E., Wodarz N., Wiesbeck G. A., Böning J., Riederer P.: *Alcohol Alcohol.* 32, 65 (1997).
48. Schneeberger H., Schleibner S., Schilling M., Illner W. D., Abendroth D., Haucke E., Janicke U., Land W.: *Transplant. Proc.* 22, 2224 (1990).
49. Porstmann, T., Wietsche R., Cobet G., Stamminger G., Bollmann R., Rogalski V., Pas P.: *Prenatal. Diagn.* 11, 295 (1991).
50. Wisniewski K., Dambaska M., Jenkins E. C., Sklower S., Brown W. T.: *Clin. Genet.* 23, 102 (1983).
51. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remack J.: *Free Radical. Biol. Med.* 77, 235 (1994).
52. Maddipati K. R., Gasparski C., Marnett L. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 254, 9 (1987).
53. Lee B. I., Park S. I., Park J. M., Chittum H. S., Lee D.: *Mol. Cells* 6, 509 (1996).
54. Cohen H. J., Chovaniec M. E., Mitretta D., Baker S. S.: *Am. J. Clin. Nutr.* 4411, 735 (1985).
55. Aebi H., v knize: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmayer H. U., ed.), sv. 2, str. 673. Verlag Chemie, Academic Press, New York 1974.
56. Gaetani G. F., Ferraris, A. M., Rolfo M., Mangerini R., Arena S., Kirkman H. N.: *Blood* 87, 1595 (1996).
57. Babior B. M.: *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 141 (1977).

J. Racek and V. Holeček (*Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Medicine, Charles University, Plzeň*): **Enzymes and Free Radicals**

Enzymes play an important role in formation and transformations of reactive oxygen forms. A survey of such enzymes is given with emphasis on their interrelations. The following enzymes important in the formation of free radicals or reactive oxygen or nitrogen forms are described in more detail: NADPH oxidase, myeloperoxidase, nitroxide synthase and xanthine oxidase. Superoxide dismutase, playing a central role in removal of free radicals catalyzes transformation of superoxide to hydrogen peroxide. The latter is removed in subsequent reactions, in which catalase and peroxidases as biocatalysts take part, glutathione peroxidase being of greatest significance. The above enzymes, their functions, structures and localization in the cell are treated in more detail. The states leading to their increased or decreased activities as well as the consequences of genetically caused defects in their synthesis are described.