



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# *Přírozené antioxidační systémy*

Antioxidační enzymy, nízkomolekulové antioxidanty

**PharmDr. Ján Vančo, Ph.D.**  
**Ústav chemických léčiv, FaF VFU Brno**

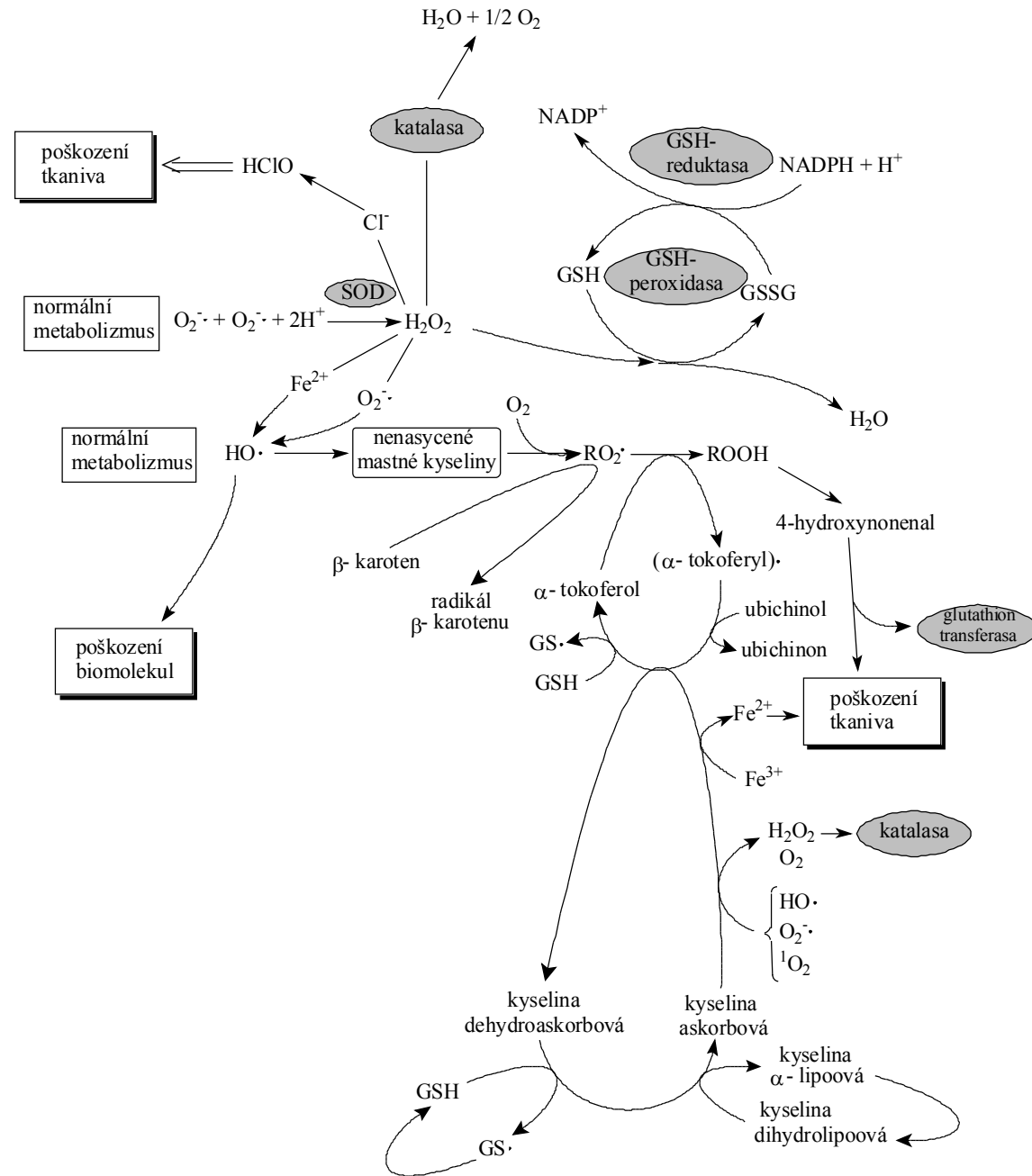
# *Antioxidační ochranné systémy*

- Tvoří spolupracující a vzájemně propojený systém
- Narušení funkce jedné části systému je možné kompenzovat zvýšením aktivity jiné části systému

## **Dle funkce je jich možné rozdělit na:**

1. Systémy vychytávající, konvertující a detoxikující RONS
2. Systémy zabraňující tvorbě RONS (např. chelatační činidla)
3. Reparační mechanismy (např. degradace poškozených proteinů, oprava oxidačně poškozených bazí, apoptosa)

# Antioxidační ochranné systémy



# *Antioxidační ochranné systémy*

## **Antioxidační systémy 1.skupiny:**

- Scavengers (vychytávače) - např. superoxiddismutasa – dismutuje superoxid na dikyslík a peroxid vodíku
- Trappers (lapače) – např. vit. E vytváří s hydroxylem stabilní radikál
- Quenchers (zhášeče) – např.  $\beta$ -karoten zháší singletový kyslík

# *Antioxidační ochranné systémy*

## **Antioxidační systémy 2.skupiny:**

- látky vytvářející redoxně stabilní komplexy s Cu(II) a Fe(II), např. transferin, albumin, desferroxamin
- inhibitory enzymů vytvářející volné radikály, např. inhibitory xantinoxidasy, která katalyzuje tvorbu superoxidu ze xantinu nebo hypoxantinu
- enzymy odstraňující peroxidy, např. katalasa nebo peroxidasy, zabraňují tak vzniku hydroxylu Fentonovou reakcí

# *Antioxidační ochranné systémy*

## **Antioxidační systémy 3.skupiny:**

- lipofilní enzymy, např. fosfolipasa A odštěpuje oxidačně poškozené mastné kyseliny
- proteolytické enzymy, které rozkládají poškozené proteiny
- reparační systémy pro opravu oxidačně poškozené DNA, např. reparační endonukleasy

# *Antioxidační ochranné systémy*

**Dle molekulové hmotnosti je jich možné rozdělit na:**

- Antioxidanty vysokomolekulové
  - enzymové
  - neenzymové
- Antioxidanty nízkomolekulové
  - přírodní
  - syntetické

**Dle místa účinku a nejčastějšího výskytu je jich možné rozdělit na:**

- cytoplazmatické (hydrofilní)
- membránové (lipofilní)

# *Antioxidační ochranné systémy*

## **Dle distribuce v různých orgánech:**

- vysoká koncentrace kyseliny L-askorbové je v oku (až mM koncentrace), kde hraje úlohu nejdůležitějšího antioxidantu v ochraně před peroxylovými radikály a dalšími ROS (doprovodními a regeneračními antioxidačními systémy jsou  $\beta$ -karoten a GSH)
- vysoká aktivita GSH dependentního antioxidačního a biotransformačního systému ( $\gamma$ -glutamyltransferasa, GPx) je v játrech
- biologicky determinovaná koncentrace antioxidantů – např. kyselina močová v ledvinách (až 10-násobně vyšší koncentrace jako v jiných tělních tekutinách)



# *Antioxidační enzymy*

## **Superoxiddismutasy**

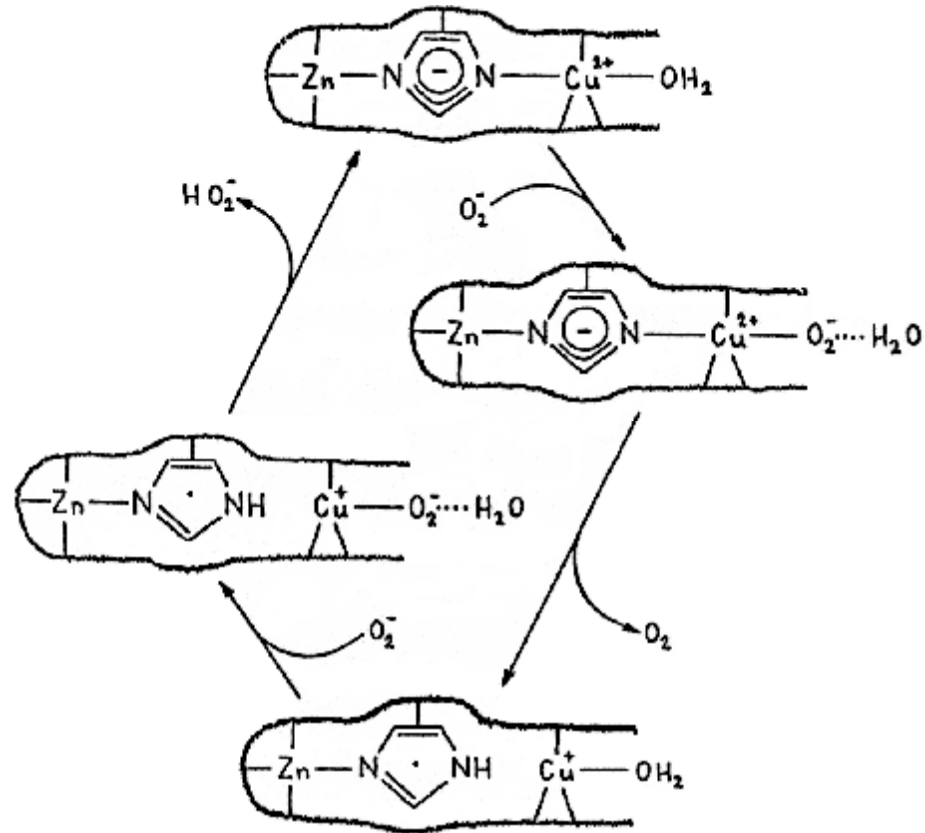
- skupina enzymů katalyzujících dismutaci superoxidu na kyslík a peroxid vodíku
- metaloenzymy - obsahují různé ionty kovů v aktivních centrech
  - Cu,Zn-SOD (SOD-1, EC-SOD)
  - Mn-SOD (SOD-2)
  - Fe-SOD
  - mutantní SOD



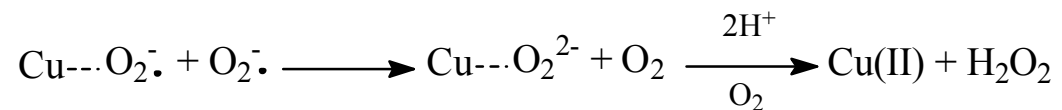
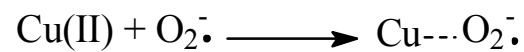
# *Cu,Zn-superoxiddismutasa*

## Mechanizmy dismutace:

- redoxní

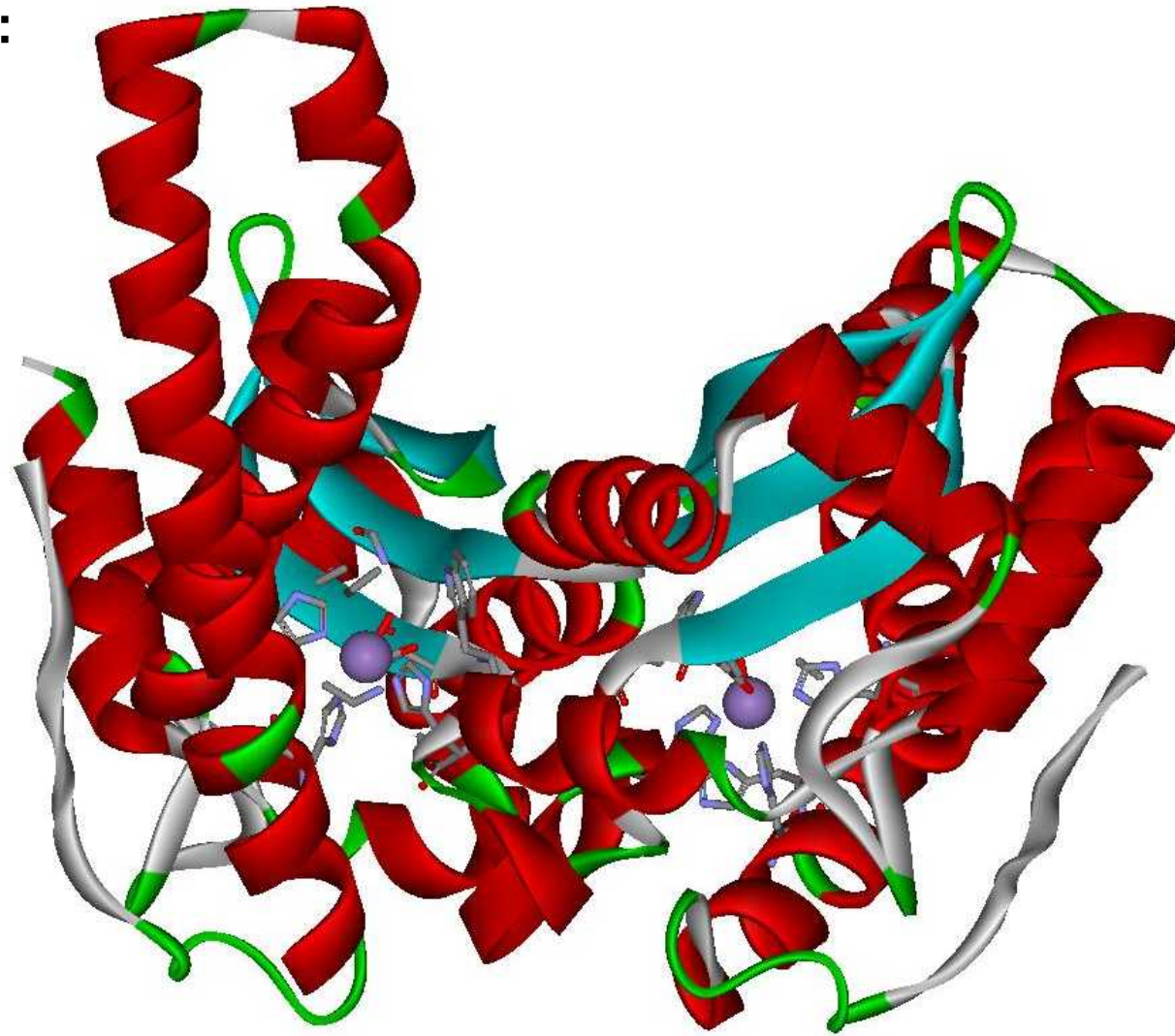


- neredoxní



# *Mn(III)-superoxiddismutasa*

**Struktura:**

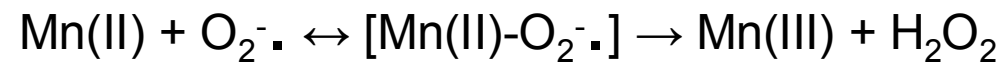
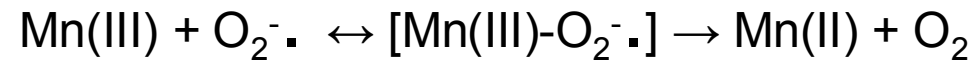


# *Mn(III)-superoxiddismutasa*

**Výskyt:** mikroorganismy, mitochondrie – v souladu s endosymbiotickou teorií původu mitochondrií

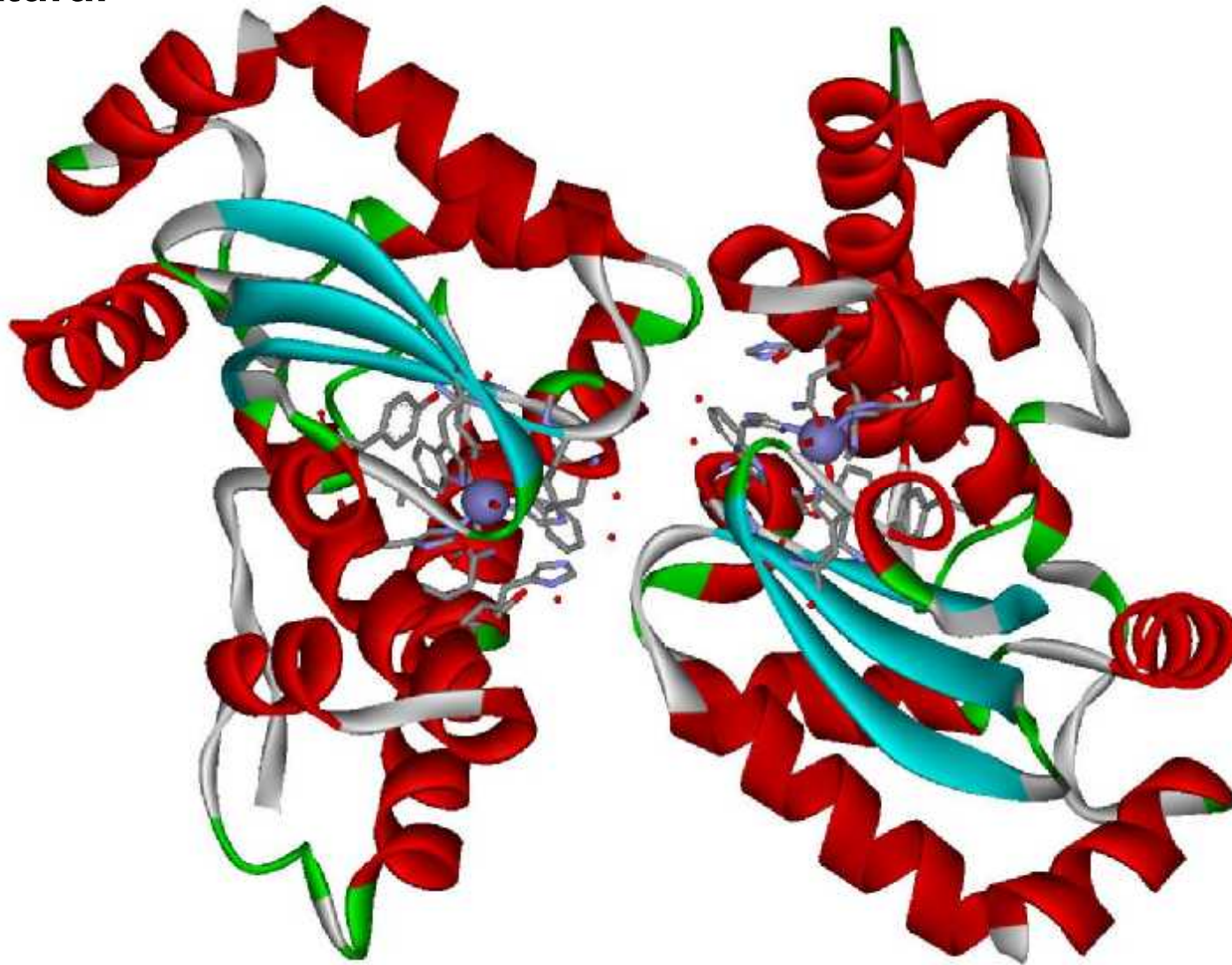
**Mechanismus dismutace:**

-redoxní



# *Fe(III)-superoxiddismutasa*

**Struktura:**

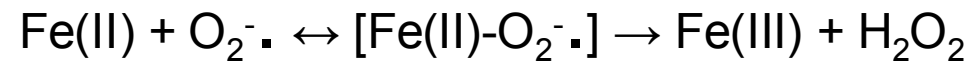
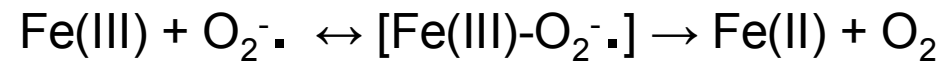


# *Fe(III)-superoxiddismutasa*

**Výskyt:** mikroorganismy *E.coli*, *B.cereus*; nenachází se v živočišných buňkách

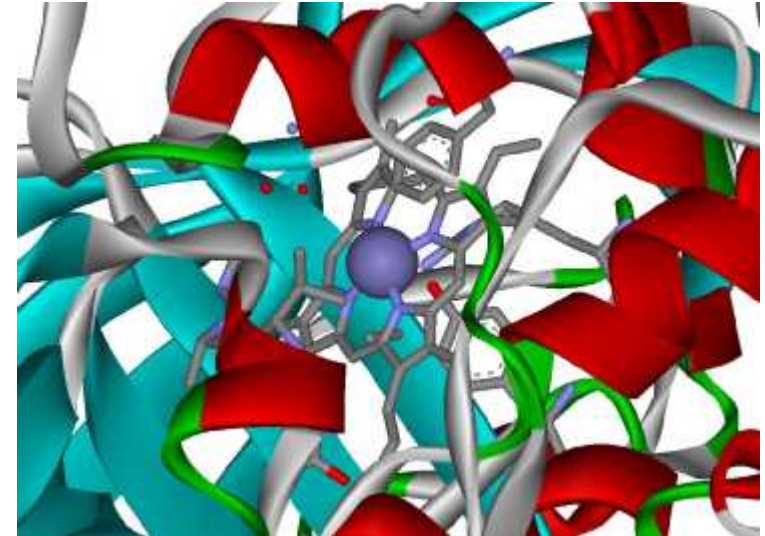
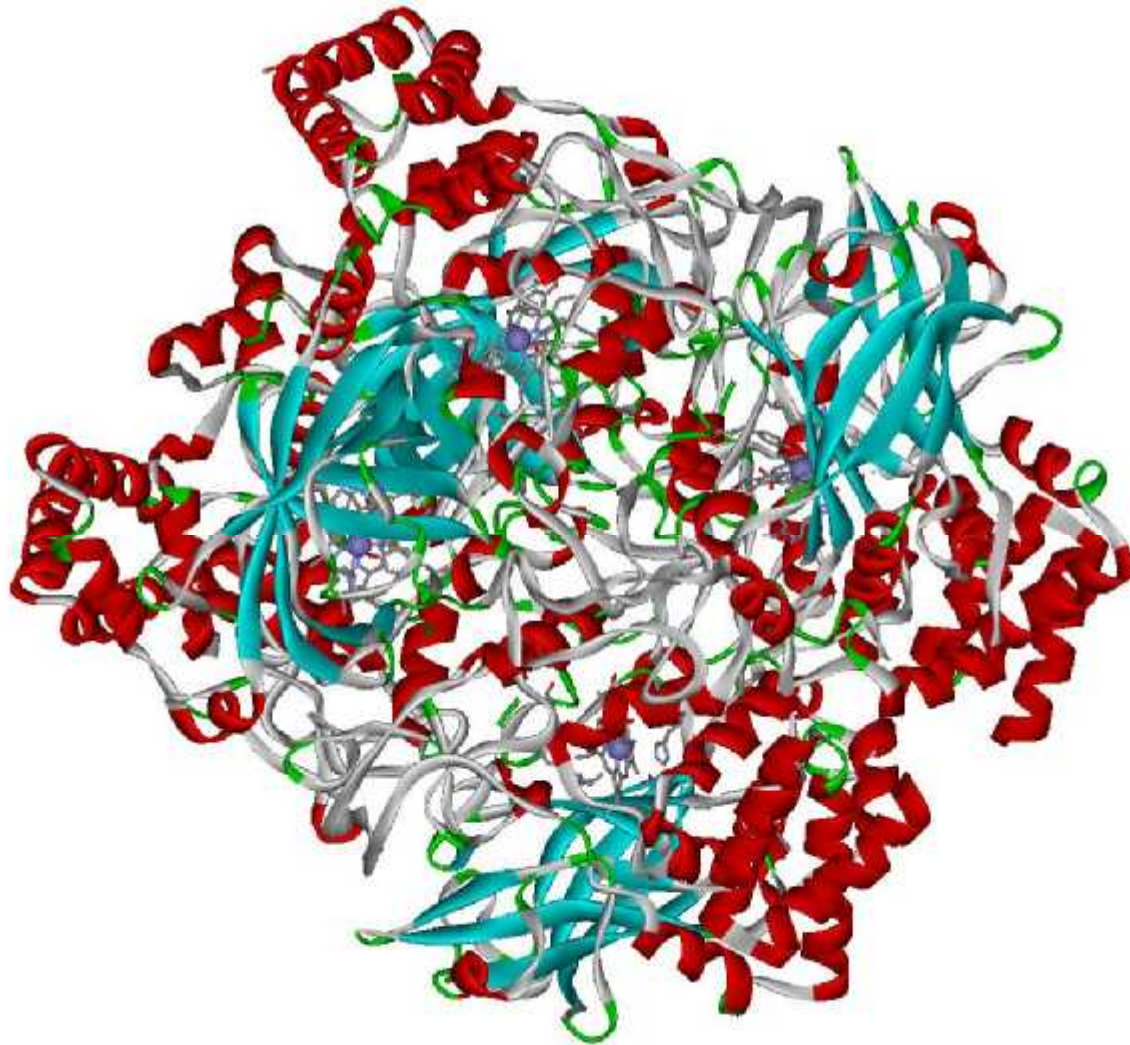
**Mechanismus dismutace:**

-redoxní



# *Katalasa*

**Struktura:**



**Aktivní centrum:**

U mikroorganismů se vyskytuje také tzv. pseudokatalasa, která obsahuje v aktivním centru mangan



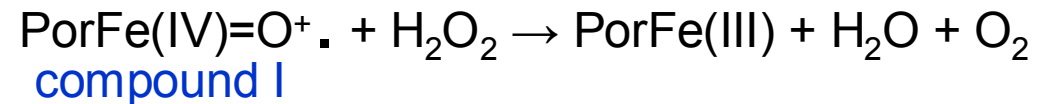
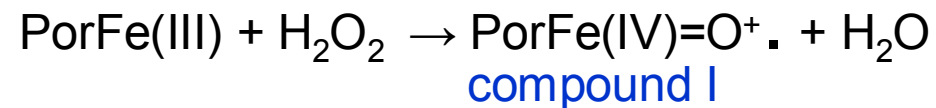
# Katalasa

**Výskyt:** u všech aerobních organismů, u člověka je nejvyšší aktivita katalasy v játrech a erytrocytech

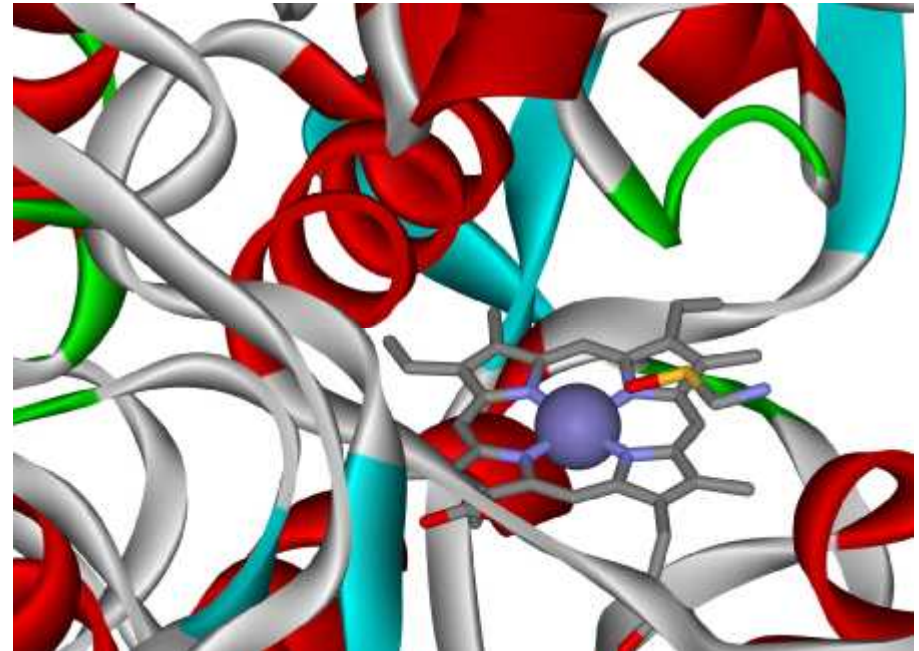
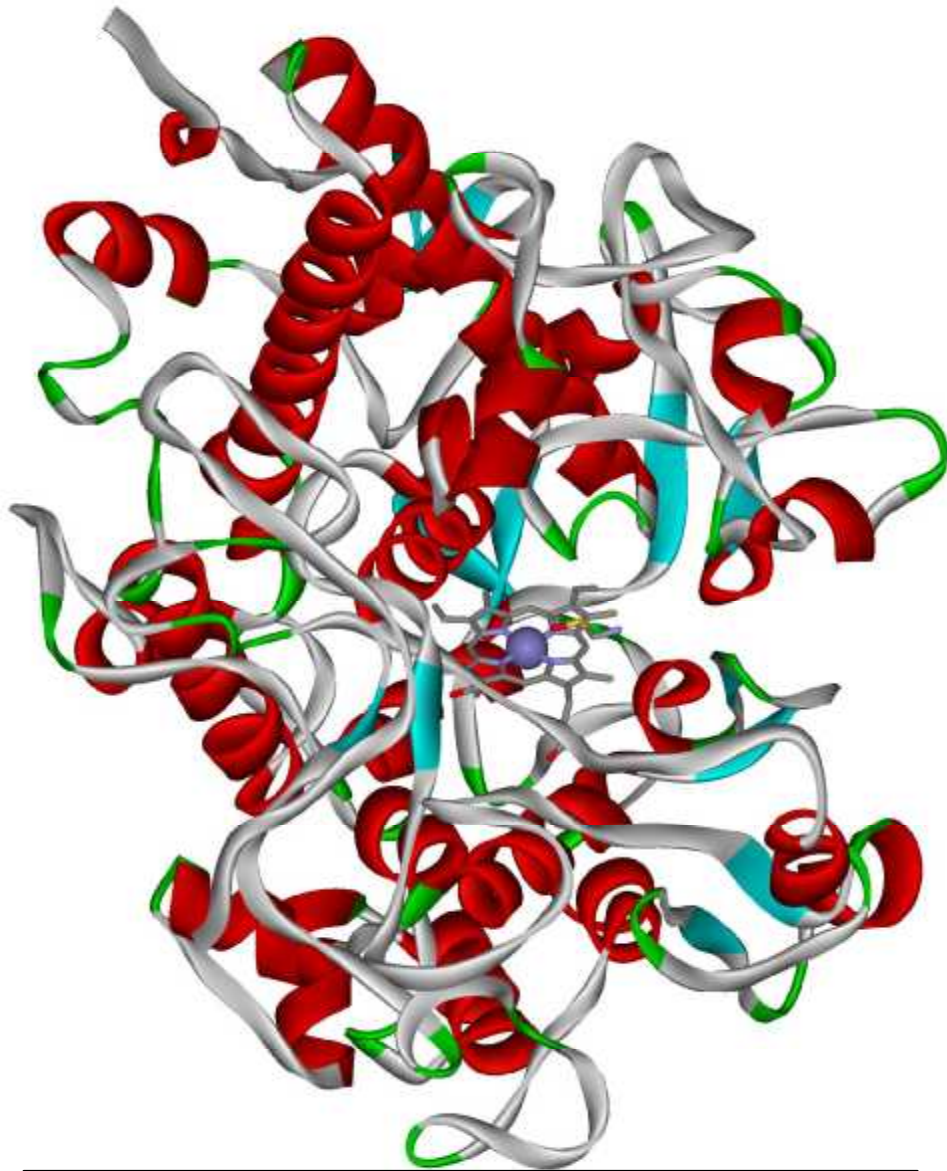
## Mechanismus rozkladu $\text{H}_2\text{O}_2$ :

-na rozdíl od peroxidasy, reaguje přímo s peroxidem vodíku

-peroxidasy využívají peroxid vodíku k oxidaci jiného substrátu

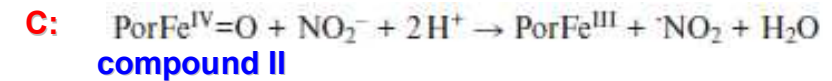
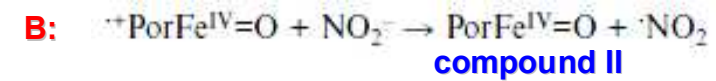
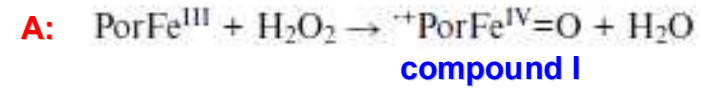
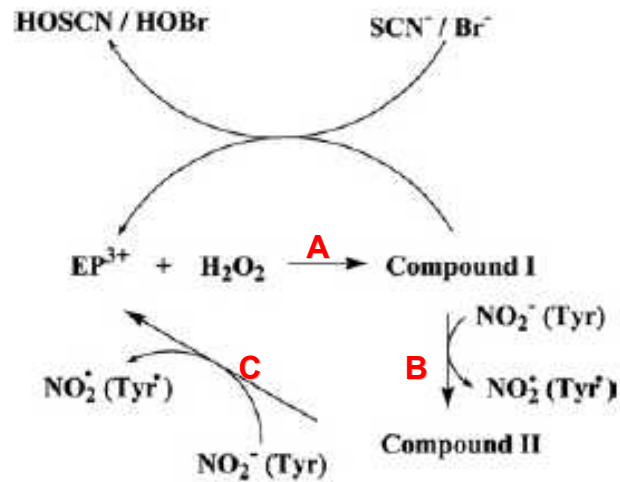


# Peroxidasy

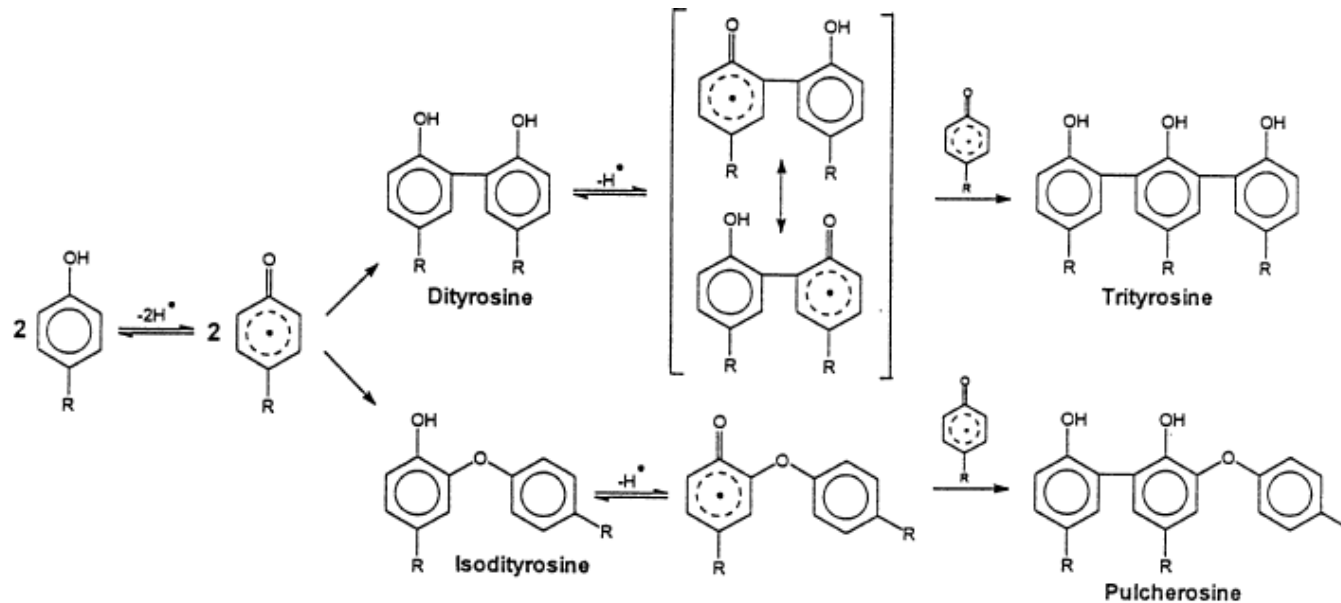


Model krystalové struktury laktoperoxidasy s  
přiblížením aktivního místa enzymu s  
navázaným oxidovaným produktem HOSCN

## Peroxidasy – mechanismus účinku



Scheme 1 The reaction mechanism for oxidation of substrates by eosinophil peroxidase



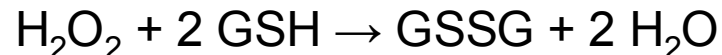
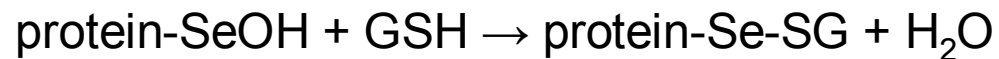
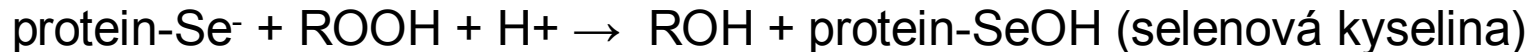
# Glutathionperoxidasy (GPx)

**Struktura:** v aktivním centru obsahuje atom selenu v aminokyselině selenocystein

**Výskyt:** jenom u živočichů, u člověka je nejvyšší aktivita GPx v játrech, krvi a ledvinách, nižší aktivita je v erytrocytech a oční čočce.

## Mechanismus účinku:

-peroxidasa využívá peroxid vodíku k oxidaci glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG)



# *Glutathionperoxidasy (GPx)*

## **Další biologicky významné peroxidasy:**

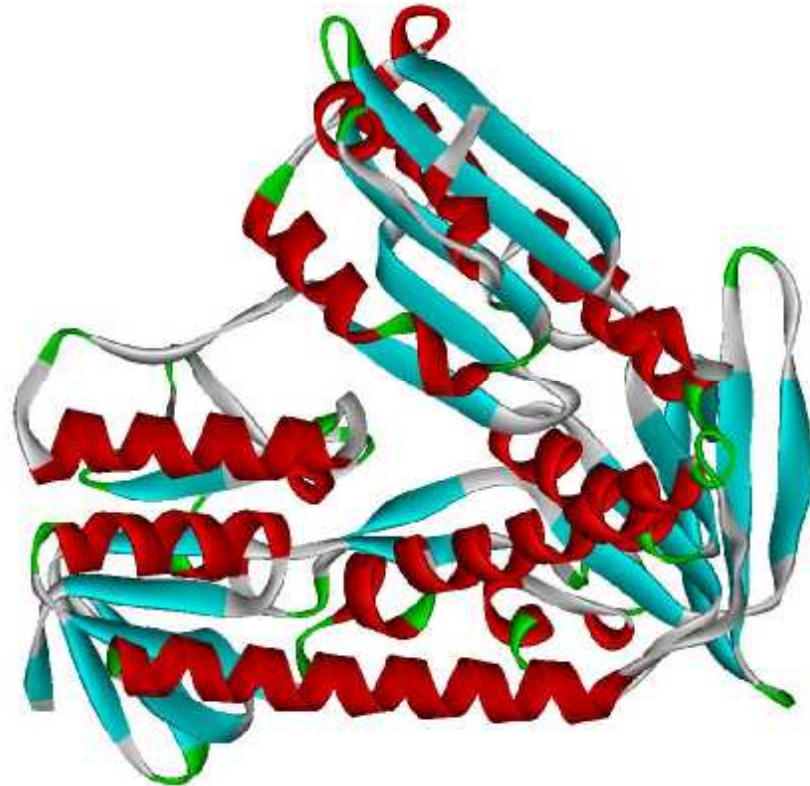
Cytochrom c peroxidasa – vyskytuje se v mitochondriích a některých bakteriích

NADH-peroxidasa

Askorbátperoxidasa

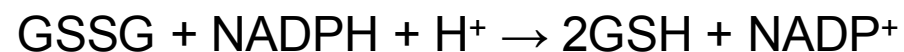
# *Glutathionreduktasa*

**Struktura:**



**Výskyt:** u živočichů i mikroorganismů, u člověka je nejvyšší aktivita v orgánech kde je vysoká aktivita GPx.

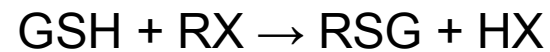
**Katalyzuje reakci:**



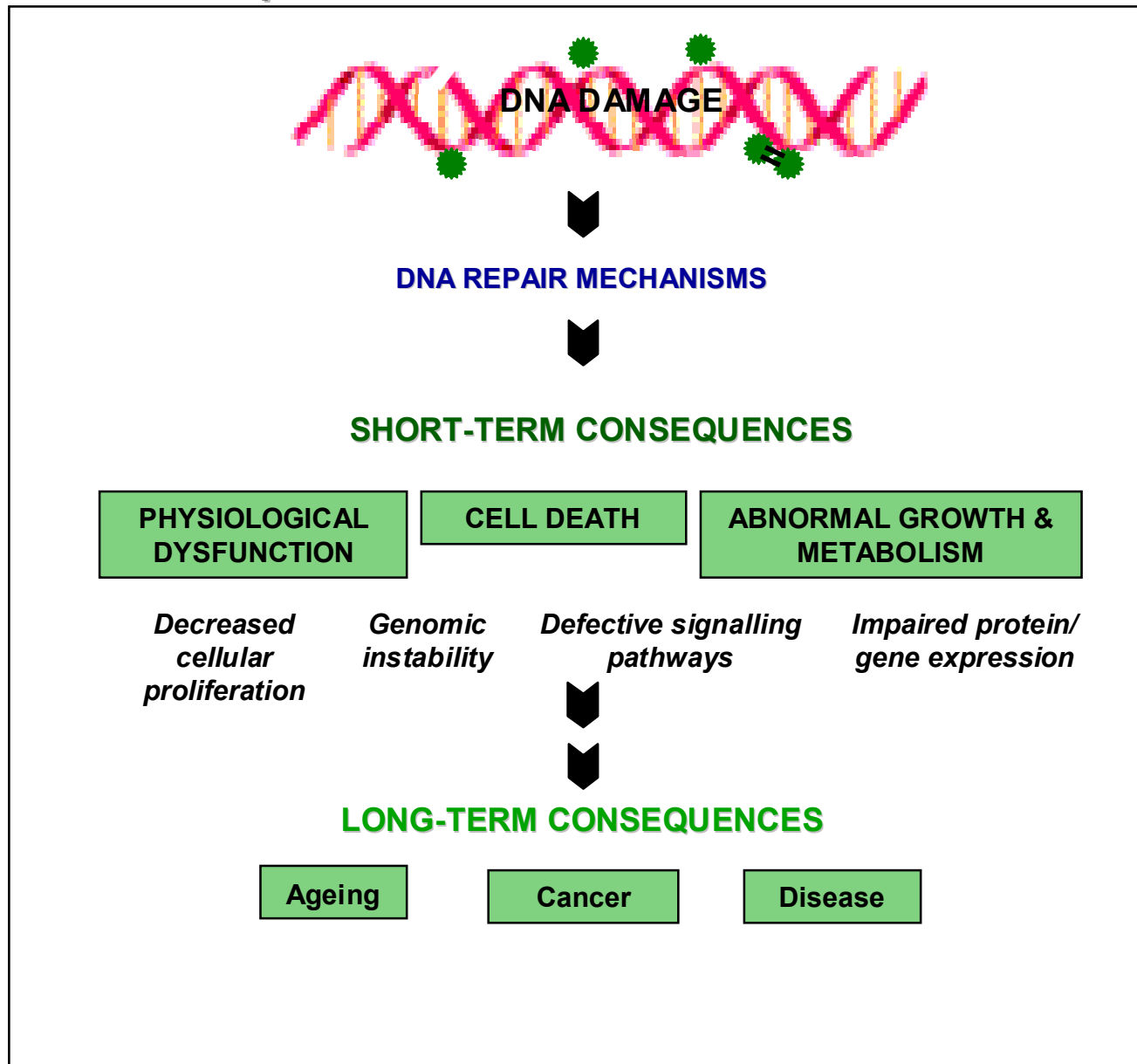
# *Glutathion-S-transferasa (GST)*

**Význam:** má velký význam při detoxikaci xenobiotik a produktů oxidačního poškození biomolekul, např. konjuguje s 4-hydroxy-non-2-enálem (4-HNE).

**Katalyzuje reakci:**



# Antioxidační systémy 3.skupiny – oprava modifikací DNA





# *Antioxidační systémy 3.skupiny – oprava modifikací DNA*

## **Význam**

- zábrana mutacím neslučitelných s životem,
- zabezpečení produkce plně funkčních proteinů transkripcí,
- modifikace epigeneticky podmíněné regulace transkripce,
- prevence karcinogeneze a geneticky podmíněných onemocnění

**Různé mechanismy jsou zprostředkovány specifickými enzymy, napojenými na enzymy obecné syntézy DNA**

## **Základní typy oprav DNA:**

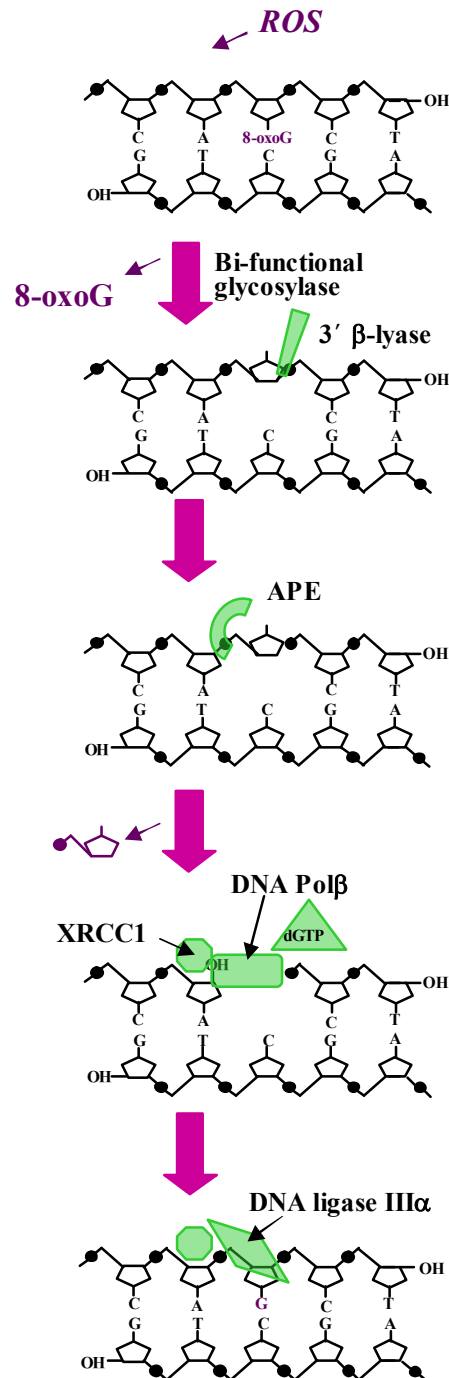
- 1. přímá místní modifikace** – cílená modifikace oxidačního poškození, nejčastěji u dimerů vzniklých působením UV-záření (světlem reaktivovaná fotolyasa) nebo methylovaných míst (v poloze 5-methylovaný cytosin a v poloze 6-*N*-methylovaný adenin) jsou demethylovány pomocí místně specifických enzymů (DNA-demethylas)

# Oprava modifikací DNA

## Základní typy oprav DNA:

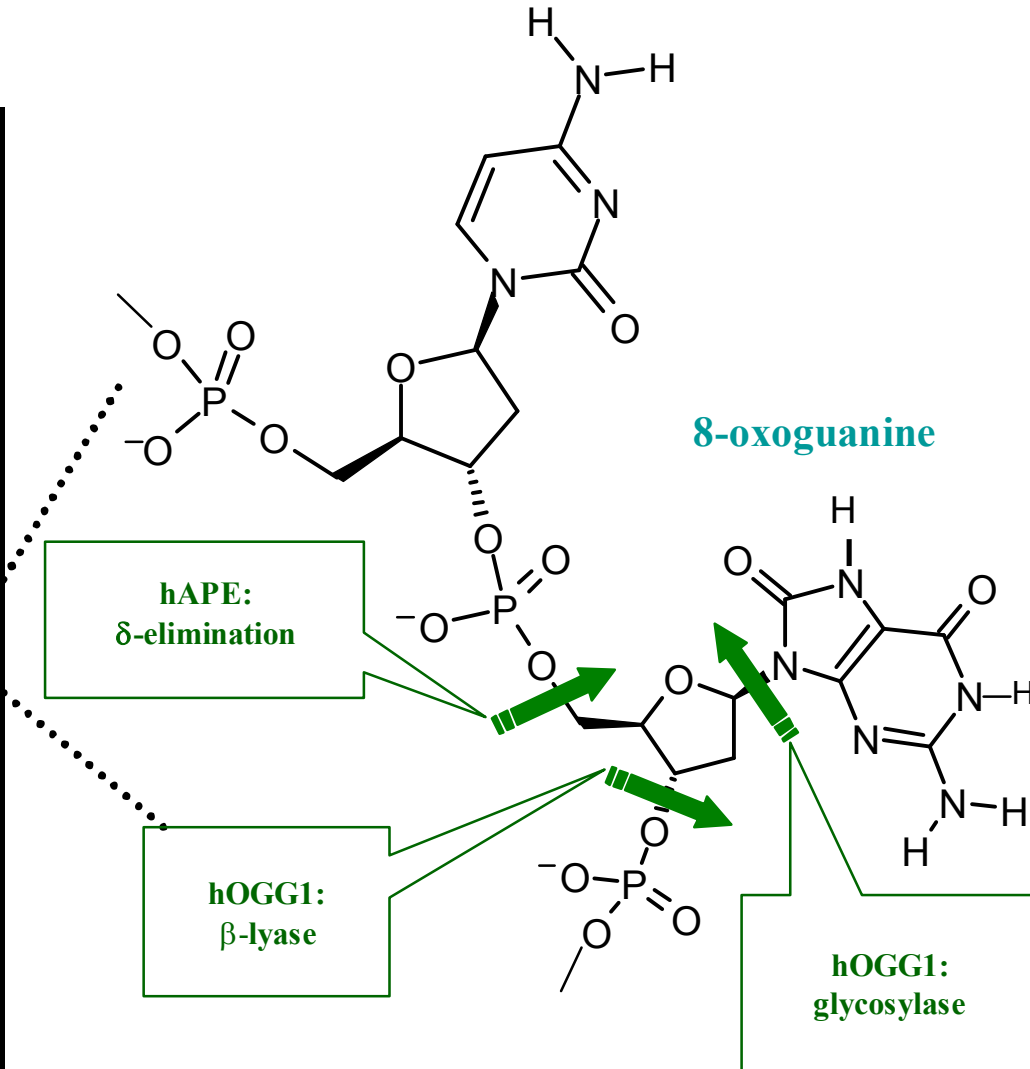
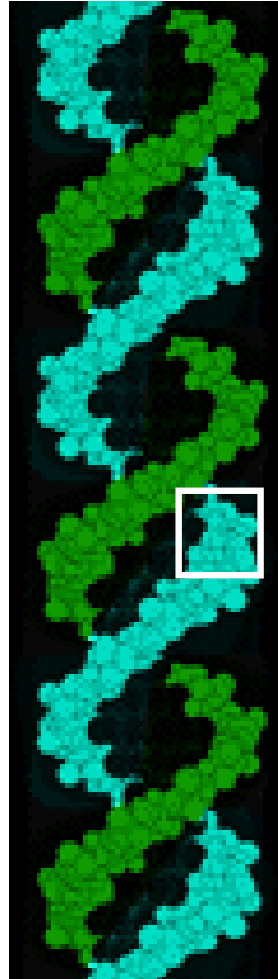
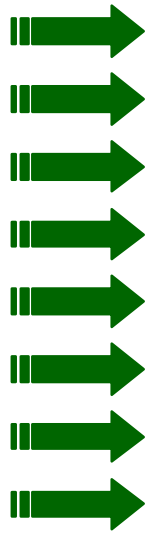
### 2. BER – Base excission repair (vystříhnutí jediné bázy) se uplatňuje

- u lézí malých rozměrů, obvykle 1-2 bázy vedle sebe
- u abázických míst a jednořetězcových zlomů
- v prvním kroku je specifickou glykosylasou odštěpená poškozená báze
- pak je pomocí b-lyasy a AP endonukleasy odštěpená deoxyribosa a komplementární báze je pak připojena DNA-polymerasou a řetězec je skompletován DNA-ligasou



## Nucleic Acids

Reactive Oxygen Species Damage



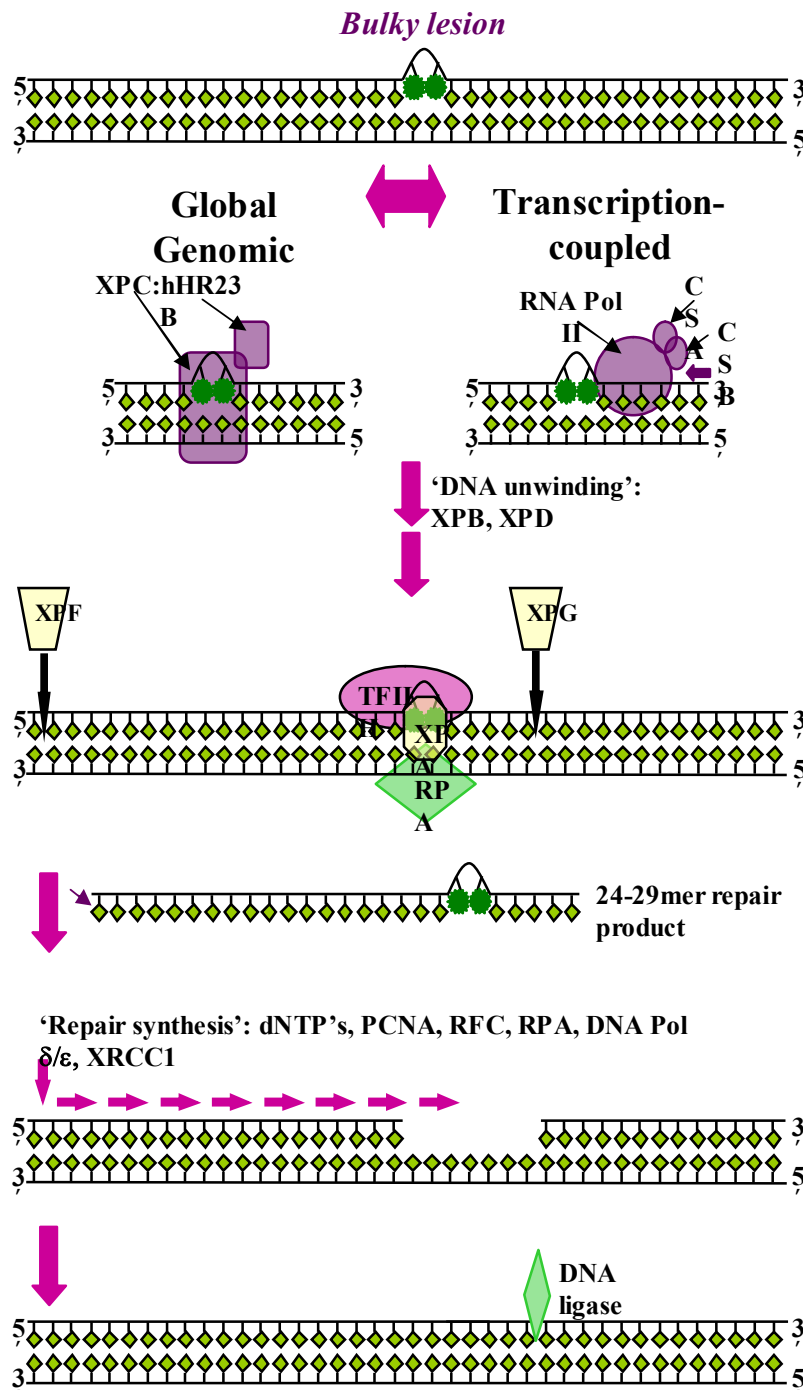
**hAPE/HAP1/REF1:** human apurinic/aprimidinic endonuclease

# Oprava modifikací DNA

## Základní typy oprav DNA:

### 3. NER – Nucleotide excision repair (vystříhnutí nukleotidu/ů) se uplatňuje

- u lézí větších rozměrů, ovlivňujících zejména tvar molekuly DNA
- je záložním systémem pro BER
- NER začíná rozdělením poškozeného vlákna DNA na dvou místech (směrem 5' i 3' od místa poškození DNA) ATP-dependentní nukleasou a uvolní se oligomer dlouhý 24-29 nukleotidů
- vzniklá díra je vyplněná komplementárními bázemi DNA-polymerasou a řetězec je obnovený DNA-ligasou

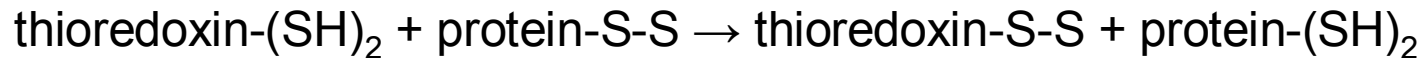


# *Thioredoxin*

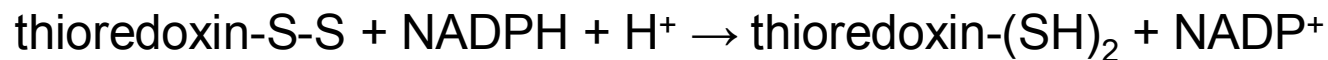
**Výskyt:** polypeptid s  $M_r = 12000$ , vyskytuje se u eukaryotů i prokaryotů; obsahuje dvě sousedící  $-SH$  skupiny cysteinů, které mohou být oxidovány za vzniku disulfidického můstku

**Význam:** je kofaktorem mnohých reparačních enzymů, např. methioninsulfoxidreduktasy nebo na thioredoxinu závislé alkyldihydroperoxidreduktasy.

**Účastní se reakce:**



- do původního redukováného stavu se dostává také pomocí enzymu thioredoxinreduktasy, která obsahuje FAD a je závislá na NADPH; strukturně i mechanismem je podobná glutathionreduktase



# *Vysokomolekulové chelatační činidla*

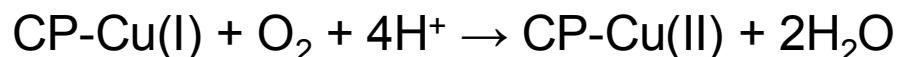
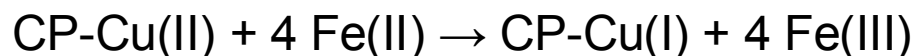
## **Vážoucí Fe(II) a Fe(III):**

- Transferin – vazbová kapacita 20-30%, obvykle váže ióny Fe(III) z transferinu, zabraňuje vzniku hydroxyly a peroxidaci lipidů
- Laktoferin – uvolňuje se degranulací PMN leukocytů, obvykle váže Fe(III), zabraňuje vzniku hydroxyly a lipoperoxidaci
- Haptoglobin – váže hemoglobin a met-hemoglobin a vylučuje je z radikálových reakcí
- Hemopexin – má vysokou afinitu k hemu, inhibuje lipoperoxidaci
- Albumin – má vysoké zastoupení v krvi (50g/l), váže Fe(II) i Cu(II), ale nezabraňuje tvorbě HO·, díky lokálnímu účinku hydroxyly se řadí mezi sebeobětující antioxidanty (self-sacrificing antioxidants)
- Ceruloplasmin – vykazuje ferroxidasovou aktivitu (oxiduje Fe(II) na Fe(III)), napomáhá reinkorporaci Fe(III) do ferritinu, reaguje přímo se superoxidem, ale nedismutuje ho!, navázané ionty Cu(II) a Cu(I) nezpůsobují tvorbu hydroxyly
- Siderofory a Hpcidin – siderofory jsou tvořeny mikroorganismy pro přímé získávání železa z lidského organismu, hepcidin těmto mechanismům brání, je syntetizován v játrech a vylučován močí, obsahuje 8 Cys z 20-25 aminokyselin

# Vysokomolekulové chelatační činidla

## Vážoucí Cu(II) a Cu(I):

- Albumin – má vysoké zastoupení v krvi (50g/l), váže Fe(II) i Cu(II), ale nezabraňuje tvorbě HO·, díky lokálnímu účinku hydroxyly se řadí mezi sebeobětující antioxidanty (self-sacrificing antioxidants)
- Ceruloplasmin – vykazuje ferroxidasovou aktivitu (oxiduje Fe(II) na Fe(III)), napomáhá reinkorporaci Fe(III) do ferritinu, reaguje přímo se superoxidem, ale nedismutuje ho!, navázané ionty Cu(II) a Cu(I) nezpůsobují tvorbu hydroxyly

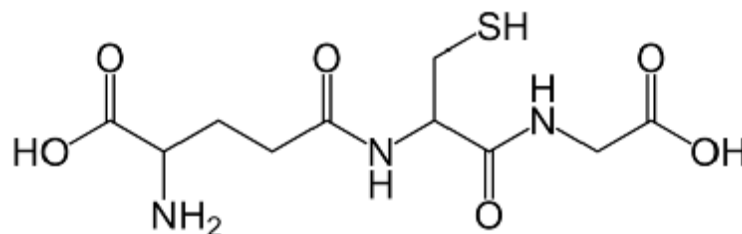


- Metalothioneiny – MT-I a MT-II v tkáních, MT-III v mozku; obsahují 23-33% sirné aminokyseliny cysteinu, vážou celou řadu těžkých kovů (5-7 iontů na molekulu), reagují se singletovým kyslíkem a hydroxyly za vzniku thiylových RS· radikálů, které se detoxikují dimerizací nebo GSH
- Fytochelatiny – vyskytují se v rostlinách a plní pravděpodobně funkci metalothioneinu

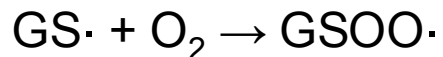
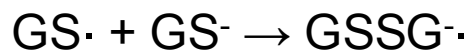
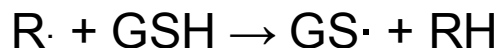
## Nízkomolekulové, v lidském těle syntetizované antioxidanty

### Glutathion (GSH)

- složení



- reaguje s hydroxylovými radikály, HOCl, peroxynitritem, alkylhydroxylmi a alkylperoxylmi, C-radikály, oxidem dusnatým a singletovým kyslíkem





# *Nízkomolekulové, v lidském těle syntetizované antioxidanty*

## **Bilirubin**

- koncový produkt degradace hemu u člověka
- váže se s albuminem a chrání ho a navázané mastné kyseliny před oxidačním poškozením
- je výrazným vychytávačem peroxylových radikálů a singletového kyslíku

## **$\alpha$ -Keto kyseliny**

- ketokyseliny jako pyruvát nebo  $\alpha$ -ketoglutarát jsou schopny vychytávat peroxid vodíku a pravděpodobně i HOCl a ONOO<sup>-</sup>

## **Steroidní hormony**

- hormony estradiol, estron a estriol jsou schopny inhibovat lipoperoxidaci (včetně peroxidace LDL)
- slouží jako blokátory řetězové reakce lipoperoxidace (reagují s alkylperoxylovými meziprodukty za vzniku stabilnějšího fenoxylového radikálu)

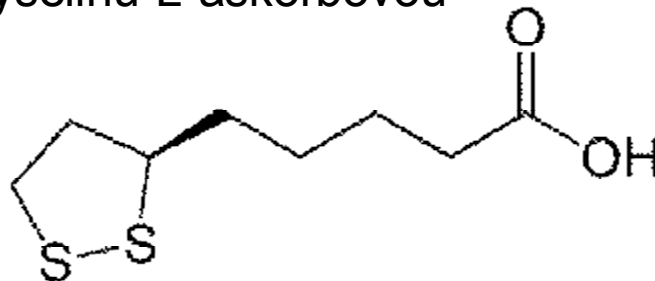
## *Nízkomolekulové, v lidském těle syntetizované antioxidanty*

### **Melatonin a serotonin**

- serotonin blokuje přímo lipoperoxidaci (vytváří stabilný fenoxylový radikál)
- melatonin není schopný účinkovat tímto mechanismem, stimuluje ale produkci antioxidantních enzymů, např. glutathionperoxidasy

### **Kyselina $\alpha$ -lipoová**

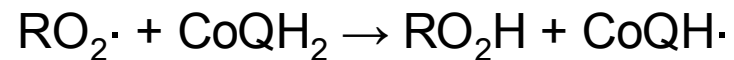
- je silným redukčním činidlem, kofaktorem mnohých enzymů, např. při dekarboxylaci ketokyselin
- reaguje s alkyperoxyly, HOCl, hydroxylovými radikály, peroxynitritem a chelatuje Cu(II) i Fe(II)
- je schopna redukovat GSSG na GSH, tokoferylový radikál na tokoferol a dehydroaskorbát na kyselinu-L-askorbovou



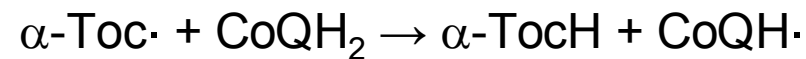
# Nízkomolekulové, v lidském těle syntetizované antioxidanty

## Koenzym Q (CoQ)

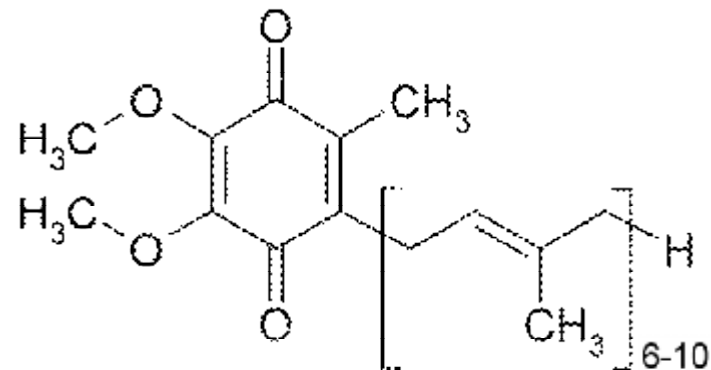
- hraje významnou roli v mitochondriálním elektrontransportním řetězci, integruje se do membrán
- v biologických systémech vystupuje v redukované formě (ubichinol – CoQH<sub>2</sub>) a oxidované formě (ubichinon CoQ), meziproductem jednoelektronové oxidace ubichinolu je semichinon (CoQH·)
- reaguje s peroxyly a tím je schopen narušit řetězovou reakci lipoperoxidace



- je schopen regenerovat tokoferolový radikál na tokoferol



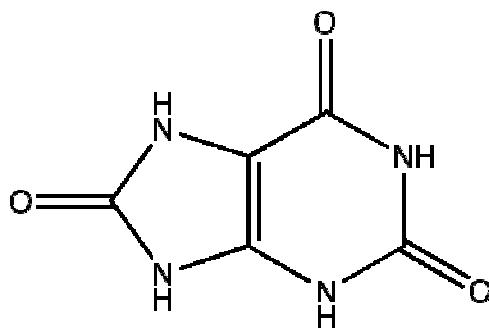
- ubichinon může být regenerován na ubichinol enzymem DT-diaforasou



## *Nízkomolekulové, v lidském těle syntetizované antioxidanty*

### **Kyselina močová**

- reaguje přímo s hydroxylovými radikály za vzniku stabilnějšího radikálu
- je výborným vychytávačem peroxynitritu a reaguje i s peroxidem vodíku a alkylperoxyly



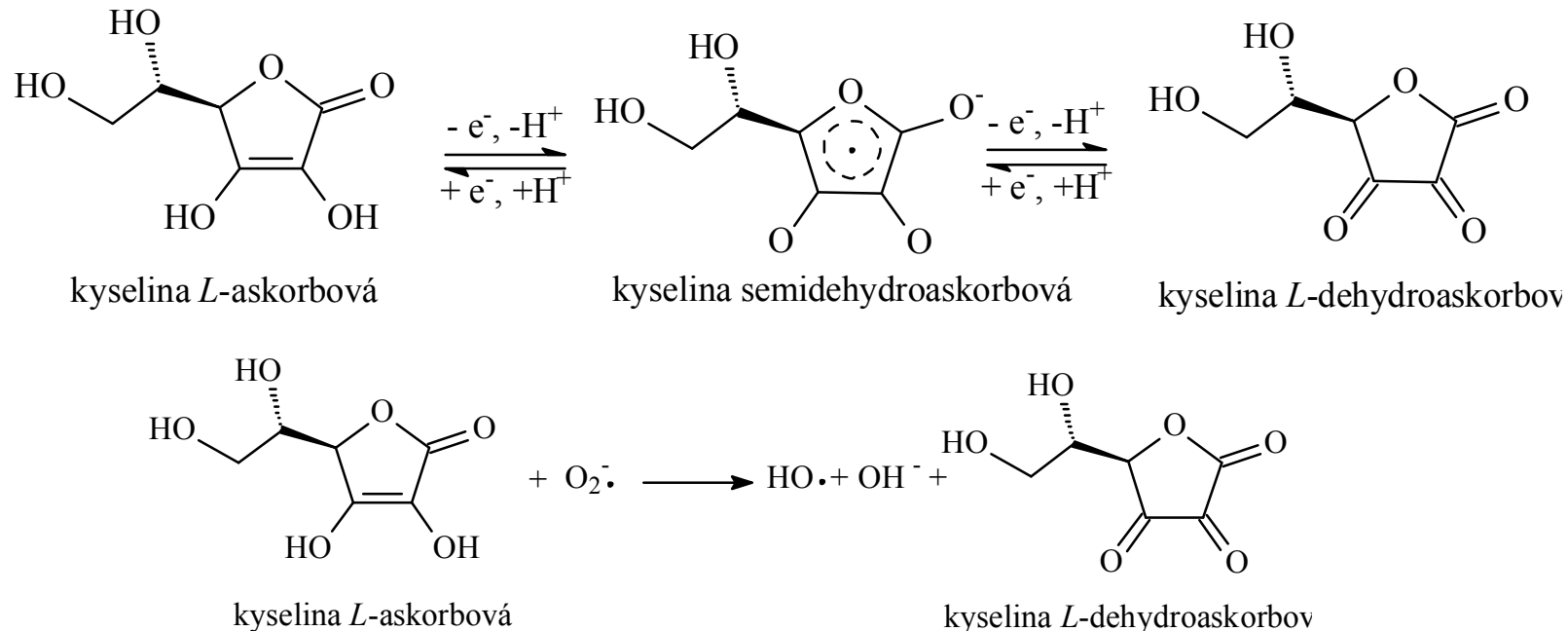
### **Další nízkomolekulové antioxidanty**

- dipeptidy obsahující histidin – karnosin, homokarnosin a anserin
- melaniny – vznikají enzymově i neenzymově z DOPA
- aminokyseliny a cystein-obsahující dipeptidy (např. cysteinylglycin)

# Vybrané nízkomolekulové antioxidanty získávané z potravy

## Kyselina L-askorbová (vitamin C)

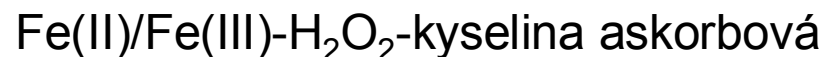
- je významným ve vodě rozpustným antioxidantem (reaguje s HO·, superoxidem, peroxyly, peroxidem vodíku, singletovým kyslíkem, thiylovými radikály nebo fenoxylými radikály)
- je také významným kofaktorem mnohých enzymů, např. prolinhydroxylasy, lysinhydroxylasy, dopamin-β-hydroxylasy, je substrátem pro askorbátperoxidasu, NADH-semidehydroaskorbátreduktasu a GSH-závislou dehydroaskorbátreduktasu



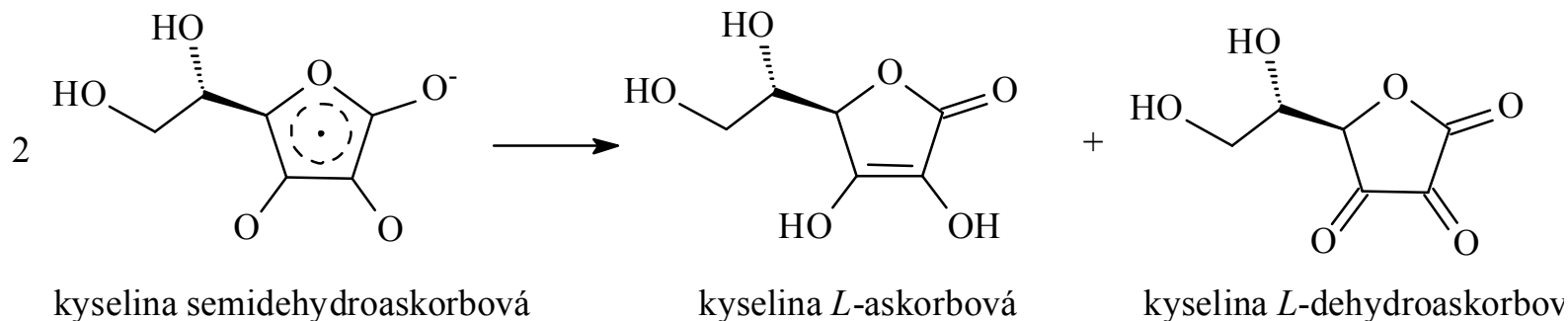
# Vybrané nízkomolekulové antioxidanty získávané z potravy

## Kyselina L-askorbová (vitamin C)

- za určitých podmínek může působit také prooxidačně, např. v systému



- kyselina L-askorbová výrazně zvyšuje rychlost této reakce, pravděpodobně cyklickou redukcí vznikajících Fe(III) na Fe(II)
- je tu terapeutické riziko pro pacienty léčené železnatými solemi v kombinaci s vitamínem C



# Vybrané nízkomolekulové antioxidanty získávané z potravy

## Tokoferol (vitamin E)

- je nejvýznamnějším vychytávačem peroxylových radikálů v membránách
- tím přerušuje řetězovou reakci peroxidace membránových lipidů

