

22 Měření glutathionperoxidasy, katalasy a superoxiddismutasy pomocí automatizovaného postupu jako ukazatele oxidační zátěže.

Nákielná J.¹, Diopan V.¹, Fabrik I.^{1,3}, Večerek M.², Kratochvílová P.², Vašátková A.², Adam V.^{1,2}, Zeman L.², Kizek R.^{1*}

1) Ústav chemie a biochemie, a Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

2) Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

3) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

* Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

Úvod

Volné radikály jsou atomy, molekuly či ionty, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron. Snaží se proto přejít do stabilního stavu reakcí s okolními částicemi, čímž zaplní orbitály. Pro organismus jsou nejvýznamnější volné radikály kyslíku a reaktivní látky vzniklé jejich přeměnami. Ty jsou označovány společným názvem reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) (Racek and Holecek, 1999). ROS u aerobních organismů vznikají spontánně jako vedlejší produkty v respiračním řetězci nebo v důsledku autooxidace hemoglobinu apod. Stav organismu, kdy se ROS tvoří v nadměrném množství, se nazývá oxidační stres. Faktory podporující tvorbu ROS mohou být fyzikální (např. UV, ionizační záření), chemické (např. těžké kovy, farmaka) nebo biologické (infekce) (Svobodova, et al., 2007, Tripathi, et al., 2007). Tyto vysoce reaktivní látky napadají neselektivně biologické struktury (proteiny, nukleové kyseliny, lipidy) to se projeví následně na jejich funkci. Chronické působení ROS na organismy může vést ke vzniku různých onemocnění (Tichavská and Gut, 1994). Mezi nejzávažnější onemocnění na jejichž vzniku se tyto látky podílejí patří zhoubné nádory (Karihtala and Soini, 2007). ROS hydroxylují purinové a pyrimidinové báze v nukleových kyselinách a tím způsobují mutace DNA (Buonocore and Groenendaal, 2007 Federico, et al., 2007). Dále mohou ROS poškozovat enzymy zapojené do detoxikací, tím brání zneškodnění potencionálních karcinogenů. Protože jsou ROS pro organismus nežádoucí, disponuje organismus ochranou schopnou je účinně eliminovat. Může být povahy neenzymatické (vitaminy C, E, β -karoten, bílkoviny a chelátové látky vázající těžké kovy), nebo enzymatické (Kulikowska-Karpinska and Moniuszko-Jakoniuk, 2004). Do níž je zahrnuto několik enzymů provádějících detoxikaci v několika stupních (obr. 1). Jedná se zejména o superoxiddismutasu, glutathionperoxidasu a katalasu. Superoxiddismutasa (SOD) katalyzuje dismutační reakci superoxidu vzniklého při metabolických pochodech na méně reaktivní peroxid vodíku. Katalasa (CAT) navazuje na působení SOD, tím že zajišťuje štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Společně s katalasou působí i efektivnější glutathionperoxidasa (GPx) štěpící peroxidy za současně oxidace glutathionu. Je zejména důležitá při odstraňování peroxidovaných lipidů z membrán. Glutathion je zpět regenerován na redukovanou formu pomocí enzymu glutathionreduktasy (GR) za současně oxidace NADPH. Mimo jiné peroxid vodíku podléhá katalytickému působení hlavně přechodných kovů a rozkládá se na hydroxylový radikál, který je nejnebezpečnější. Tato škodlivá reakce se uplatňuje pokud není peroxid dostatečně rychle odbouráván popsánými enzymy (Mates, et al., 1999, Michiels, et al., 1994, Peskin, 1997).

Organismus má jisté možnosti v regulaci zvýšené tvorby ROS v podobě indukce antioxidačně ochranných mechanismů. Situace, kdy k tomu dochází nejsou neobvyklé a zahrnují toxické působení látek v životním prostředí a chronické onemocnění. Stejně tak mohou být ochranné mechanismy škodlivými látkami inhibovány s důsledkem menší schopnosti odbourávat ROS. Jednou z možností jak hodnotit antioxidační ochranu a stav metabolismu ROS je zjištění aktivit oxidačně protektivních enzymů.

V naší práci jsme hodnotili efekt zinku na základní ochranné enzymy. Snažili jsme se popsat zda po vysokých dávkách zinku přijímaného v potravě je ovlivněna tvorba nebo zpracování ROS a zda můžeme tento efekt popsat jako pozitivní či jako toxické působení. K testování jsme využili dvě formy zinku jako modelu minerálních léčivých doplňků.

Materiál a metody

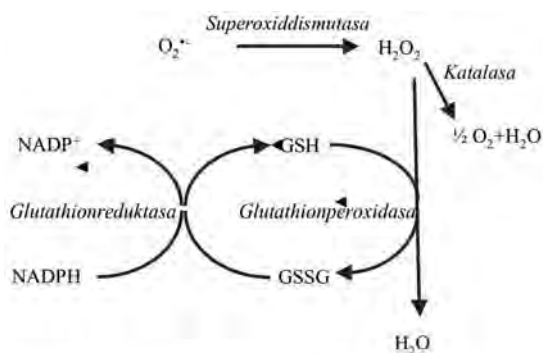
Biologický materiál

K experimentu byli použiti rostoucí samci laboratorního potkana outbredního kmene Wistar albino z konvenčního chovu LF Masarykovy univerzity v Brně. Průměrná počáteční hmotnost ve skupině se pohybovala v rozmezí 75,2 až 75,7 g. U potkanů byl zjišťován vliv dvou forem zinku na antioxidační enzymy. K pokusu byly využity dvě skupiny potkanů. Obě dvě skupiny dostávaly zinek v krmné dávce, která obsahovala 150 mg Zn na kilogram krmiva. První skupině byl podáván zinek v anorganické formě ZnO a druhé v podobě chelátu určenému jako doplněk stravy pro hospodářská zvířata dodávaný firmou KHEIRON s.r.o. Pokus trval sedm týdnů. Každý týden se zvířatům odebrala krev pro stanovení aktivity enzymů.

Příprava vzorků

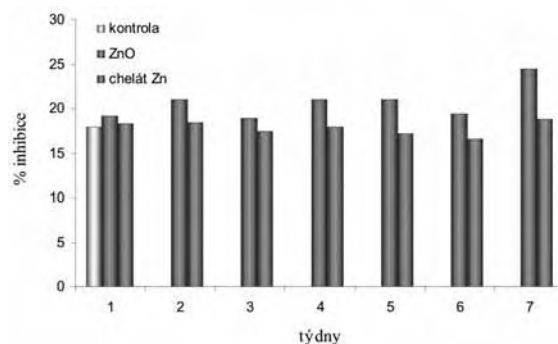
Získaná krev se okamžitě po odběru smísila s citronanem sodným (20 mg.ml⁻¹) pro zabránění koagulace. Pak bylo odebráno 20 μ l krve do 1 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl). Suspenze erytrocytů byla centrifugována při 1000 ot/min 10 minut. Roztok NaCl byl vyměněn a postup opakován. Získaný pelet erytrocytů byl hemolyzován 1 ml deionizované vody. Hemolýzát byl následně použit ke stanovení enzymů.

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE



obr. 1

Schéma působení hlavních antioxidačních enzymů



obr. 2

Graf aktivity superoxiddismutasy v průběhu sedmi týdnů

Stanovení aktivity:

Všechna spektrofotometrická měření byla prováděna na analyzátoru (BS-200 Chemistry analyzer, Mindray, Čína) s kyvetovým prostorem temperovaným na 37 °C. Aktivita byla vyjadřována v U/g hemoglobinu (Hb). Množství Hb se stanovilo metodou dle Drabkina po jeho převedení na kyanomethemoglobin kdy se smíchalo 30 μ l hemolyzátu s 300 μ l Drabkinova roztoku (0,77 mM KCN, 0,6 mM $K_3(Fe(CN)_6)$ v 1 mM NaH_2PO_4), po 5 min byla transformace dokončena a absorbance kyanomethemoglobinu byla změřena při 546 nm (Wendel and William, 1981).

Katalasa: Aktivitu katalasy jsme určili z úbytku peroxidu vodíku po jeho inkubaci se vzorkem. Na mikrotitrační destičce bylo k 50 μ l vzorku (koncentrace 1 mg Hb/ml), přidáno 50 μ l 100 mM H_2O_2 . Reakce byla ukončena po 1 minutě přidáním 50 μ l 200 mM NaN_3 . Poté byla směs zředěna na 0,5 ml a v ní jsme stanovili nespotřebovaný peroxid pomocí vzniku barevného produktu měřením absorbance při 510 nm.

Superoxiddismutasa:

Aktivita superoxiddismutasy byla stanovována spektrofotometricky pomocí soupravy SOD assay kit (Fluka, Německo). Reakční směs byla tvořena 30 μ l hemolyzátu (koncentrace 0,75 mg Hb/ml), 300 μ l WST pracovního roztoku a 30 μ l enzymového pracovního roztoku. Měřilo se procento inhibice vzniku formazánu, který vzniká reakcí s enzymaticky generovaným superoxidem. Reakce byla monitorována při vlnové délce 450 nm po dobu 20 minut

GPx

Aktivita glutathionperoxidasy byla zjištěna dle úbytku NADPH v recyklující reakci oxidace a redukce glutathionu (Wendel and William, 1981). Reakční roztok pro stanovení GPx obsahoval 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA, glutathion reduktasu v množství 1 U/ml, 0,3 mM NADPH a 6 mM GSH v 37 mM fosfátovém pufru o pH 7. K 200 μ l tohoto roztoku bylo pipetováno 45 μ l vzorku, který byl připraven zředěním a transformováním hemolyzátu na koncentraci 3 mg(Hb).ml⁻¹ přičemž na každý mg Hb bylo přidáno 80 μ g KCN a 100 μ g $K_3(Fe(CN)_6)$. Směs vzorku a reakčního roztoku se nechala 10 minut inkubovat. Reakce byla zahájena přidáním 55 μ l 7,2 mM tert-butyl-hydroperoxidu. Zaznamenával se pokles absorbance při 340 nm.

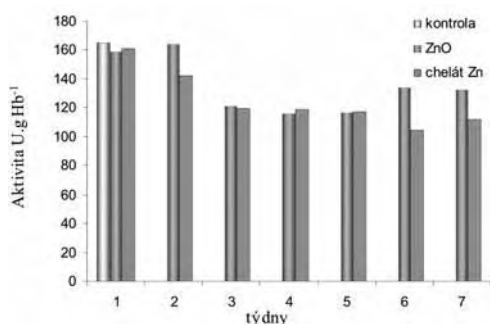
Výsledky

CAT

Kataláza se většinou stanovuje přímo metodou jež popsal Aebi, kdy se využívá absorbce samotného 10 mM peroxidu vodíku při 240 nm a aktivita se určí ze změny absorbance v čase způsobenou jeho rozkladem (Aebi, 1984). Automatizované biochemické analyzátoři však v potřebné UV oblasti nepracují. Proto jsme převedli nespotřebovaný peroxid vodíku po reakci ze vzorkem na barvený chinonimid. Využili jsme peroxidasu, která katalyzuje oxidaci metylfenolu na chinon jež následně reaguje s aminoantipyrinem. Provedli jsme optimalizaci postupu stanovení se standardem katalázy z hovězích jater. Metodou jsme stanovili aktivitu v erythrocytech ovlivněných potkanů. Hodnota aktivity u kontrolní skupiny se pohybovala mezi 140-170 kU.g(Hb)⁻¹ a nejevila závislost na stáří potkana. U experimentálních potkanů se objevily první změny až třetí týden a to pouze u skupiny krmené chelátem zinku, kdy byla změřena aktivita 182 kU.g(Hb)⁻¹. V průběhu dalších týdnů se aktivita dále zvyšovala a na konci experimentu byla 190 kU.g(Hb)⁻¹ tedy o 13 % vyšší než horní mez u kontrolní skupiny. U potkanů s přísunem ZnO aktivita katalázy vzrostla nad horní mez kontrolní skupiny až v šestém a sedmém týdnu a to jen mírně. Bylo popsáno, že některé sloučeniny zinku mohou katalázu stabilizovat in vitro (Garcia-Canadas, et al., 2002). Předpokládáme, že se zde uplatnil tento efekt ochrany enzymu v erythrocytech. Důsledkem vedoucím nakonec ke zvýšení aktivity by bylo tedy prodloužení životnosti enzymu a nikoli jeho indukce zaviněná tvorbou peroxidu vodíku vyvolaného zinečnatými ionty. Tomu nenasvědčuje aktivita SOD, která byla naopak u skupiny vystavené chelátu menší než u skupiny s ZnO.

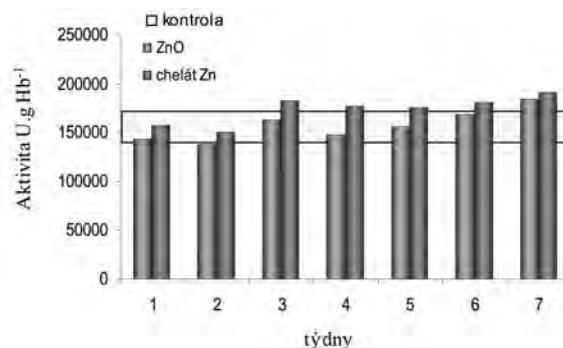
Rozdílné výsledky u obou skupin spočívají buď v rychlejším ustálení koncentrace zinku v organismu po chelátu zinku nebo ve specifickém působení zinečnatého komplexu.

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE



obr. 3

Graf aktivity glutathionperoxidasy v průběhu sedmi týdnů



obr. 4

Graf aktivity katalasy v průběhu sedmi týdnů

GPx

V použité metodě stanovení se určuje aktivita všech izoform enzymu. Reakci lze uskutečnit jak se samotným peroxidem vodíku tak i s některými organickými hydroperoxidy. Nicméně neenzymatická peroxidace glutathionu probíhá velmi rychle. U peroxidu vodíku jsme pozorovali velmi rychlou reakci ($43,4 \text{ nmol}_{\text{NADPH}} \cdot \text{min}^{-1}$ v $0,3 \text{ ml}$ reakční směsi). Použití hydroperoxidů je vhodné z důvodu nižší rychlosti samovolné reakce, která u *t*-butylhydroperoxidu činí ($5,7 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{NADPH}} \cdot \text{min}^{-1}$ v $0,3 \text{ ml}$ reakční směsi) a je tedy 7,5 krát pomalejší než u peroxidu vodíku. Peroxidaci urychluje rovněž v hemolýzátu přítomný hemoglobin. Ten se ovšem nepodílí na rozkladu peroxidu za fyziologických podmínek pro jeho nízkou koncentraci. Jeho aktivita se proto blokuje převedením na kyanomethemoglobin. V experimentu jsem používali vzorek zředěný na $3 \text{ mg HB} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Aktivita celkové glutathionperoxidasy měřená v hemolýzáte u kontrolní skupiny byla $164 \text{ U} \cdot \text{g}(\text{Hb})^{-1}$. Efekt zinku na tento enzymatický systém se projevil třetí týden poklesem aktivity u obou skupin o asi 25 % na $119 \text{ U} \cdot \text{g}(\text{Hb})^{-1}$. Další týdny již aktivity neklesaly. U skupiny chelátu viditelný pokles nastal ve druhém týdnu na $142 \text{ U} \cdot \text{g}(\text{Hb})^{-1}$ o 13 %. Vysvětlujeme si to tak, že chelátová forma zinku vzhledem k lepšímu vstřebávání dosáhla dříve koncentrací majících vliv na aktivitu enzymu. Inhibice tohoto systému může vést k neschopnosti účinně odbourávat peroxid vodíku a peroxidované lipidy v případě zvýšené oxidativní zátěže. Protože se vliv zinku projevil po delší době vylučujeme přímé působení na enzym. Pokles aktivity souvisí s poklesem tvorby nového enzymu. Tato skutečnost naznačuje, že se snížila jeho potřeba.

SOD

SOD byla stanovovaná za použití komerčního setu. Postup uvedený v setu je vhodný pro uskutečnění měření v readru na mikrotitrační destičce, protože pracuje s malými objemy vzorku. Aby bylo možné měřit v automatizovaném systému, museli jsme navýšit objem pipetovaných činidel o jednu třetinu při zachování objemového poměru činidla a vzorku. Aby se vyloučilo ovlivnění látkami s redukčními vlastnostmi jako redukovaný glutathion vyžaduje stanovení měření tří blanků. Nicméně při analýzách v hemolýzáte jsme nepozorovali interakci s těmito látkami, která by se projevila na naměřené aktivitě a proto jsme od měření dvou blanků upustili. Metoda neumožňuje přímé stanovení aktivity na základě látkové přeměny v čase. Zjišťují se procenta inhibice reakce superoxidu s tetrazoliovou solí, která jeví logaritmickou závislost na aktivitě. Pro získání skutečné aktivity by se musela vytvořit kalibrační závislost známé SOD aktivity na stupni inhibice reakce.

Ze změn aktivity SOD vyplývá mírné zvýšení u skupiny ZnO v porovnání s kontrolou. Skupina s přísunem chelátu se nelišila od kontrolní skupiny. Anorganická forma zinku zřejmě zvyšovala celkové oxidační zatížení. K produkci ROS mohl vést rozklad peroxidu vodíku podobným průběhem jako při fentonově reakci. Chelátová forma zinku se projevila jako výhodnější, protože její koordinační sféra byla pravděpodobně blokována chelátem a zřejmě tedy postrádala katalytické schopnosti anorganické formy zinku.

Závěr

Modifikovali jsme běžné biochemické stanovení využívající aminoantipyrin pro změřeni aktivity katalasy a přenesli metodu stanovení glutathionperoxidasy a superoxiddismutasy pro provedení na běžném analyzátoru. Stanovení těchto enzymů patří k testům, které informují o stavu antioxidační ochrany organismu. Lze jimi posoudit vliv faktorů na vznik oxidativního stresu. V experimentu jsme posuzovali zda větší dávky zinku než fyziologicky nutné, přispívají ke zvýšené tvorbě volných radikálů. Nalezli jsme během experimentu změny aktivit enzymů v čase.

Pravděpodobně ne všechny změny lze připsat nárůstu ROS. Zvýšení katalasy pravděpodobně souvisí s interakcí zinku s enzymem. Snížení GPx již může mít vliv na antioxidační ochranu organismu a přispívat k horší schopnosti se vyrovnat s nárůstem ROS. Indukce SOD byla zaznamenána pouze u skupiny krmené ZnO. Předpokládáme, že tato forma zvýšila tvorbu superoxidového radikálu. Změny aktivity antioxidačních enzymů v erytrocytech jednoznačně neprokázaly, že nadbytečné množství zinečnatých iontů vyvolává oxidativní stres.

Literatura

1. AEBI, H. Catalase Invitro. *Methods in Enzymology*, 1984, roč. 105. č., s. 121-126.
2. BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2007, roč. 12. č. 4, s. 287-295.
3. FEDERICO, A.; MORGILLO, F.; TUCCILLO, C.; CIARDIELLO, F.; LOGUERCIO, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 2007, roč. 121. č. 11, s. 2381-2386.
4. GARCIA-CANADAS, J.; PEREZ, J. M.; QUIROGA, A. G.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Determination of catalase activity in samples treated with [ZnCl₂(isopropylamine)₂]: a novel zinc complex that slows down the decay in activity of catalase extracts. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2002, roč. č. 11, s. 2283-2288.
5. KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis*, 2007, roč. 115. č. 2, s. 81-103.
6. KULIKOWSKA-KARPINSKA, E.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. The antioxidative barrier in the organism. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2004, roč. 13. č. 1, s. 5-13.
7. MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 1999, roč. 32. č. 8, s. 595-603.
8. MICHELIS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-Sod for Cell-Survival against Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, roč. 17. č. 3, s. 235-248.
9. PESKIN, A. V. Cu, Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: A review. *Bioscience Reports*, 1997, roč. 17. č. 1, s. 85-89.
10. RACEK, J.; HOLECEK, V. Enzymes and free radicals. *Chemicke Listy*, 1999, roč. 93. č. 12, s. 774-780.
11. SVOBODOVA, A.; ZDARILOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Flavonolignans from *Silybum marianum* moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 2007, roč. 48. č. 3, s. 213-224.
12. TICHAVSKA, B.; GUT, I. Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Chemicke Listy*, 1994, roč. 88. č. 9, s. 580-590.
13. TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J. P. Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chemistry*, 2007, roč. 100. č. 1, s. 81-90.
14. WENDEL, A.; WILLIAM, B. J. [44] Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*: Academic Press, 1981 (vol Volume 77).

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantu GA AV IAA401990701