

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

SEMINARSKI RAD

**ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI KAO BIOMARKERI  
OKSIDACIJSKOG STRESA**

ANTIOXIDATIVE ENZYMES AS BIOMARKERS OF  
OXIDATIVE STRESS

Mihaela Šurina

Preddiplomski studij biologije  
(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2018.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	2
2. OKSIDACIJSKI STRES .....	3
2.1. Reaktivne vrste i slobodni radikali.....	3
3. BIOMARKERI OKSIDACIJSKOG STRESA.....	6
4. ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI.....	9
4.1. Superoksid dismutaza (SOD).....	9
4.2. Katalaza (CAT) .....	10
4.3. Glutation-ovisni enzimi.....	12
4.3.1. Glutation peroksidaza (GPX) i Glutation reduktaza (GR) .....	13
4.3.2. Glutation-S-transferaza(GST) .....	14
5. LITERATURA .....	15
6. SAŽETAK .....	17
7. SUMMARY .....	17

## 1. UVOD

Pojavom fotosintetskih organizama prije 2,7 milijarde godina i otpuštanjem kisika u atmosferu dolazi do drastične promjene u načinu iskorištavanja resursa. Organizmi koji su počeli koristiti kisik u metaboličkim reakcijama dobivali su puno više energije razgradnjom hrane, što je dovelo do usložnjavanja i razvoja višestaničnih organizama, no metabolizam baziran na kisiku predstavlja za živa bića dvosjekli mač (Das i sur., 2012).

Kao nusprodukti oksidacijskog metabolizma u organizmu konstantno nastaju slobodni radikali i reaktivne molekule od kojih su najčešće one izvedene iz kisika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) kao što su superoksidni anion ( $O^{2-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni anion (OH). U fiziološki povoljnim uvjetima oni ne predstavljaju opasnost jer ih neutraliziraju antioksidacijski mehanizmi koji održavaju reducirajući mikrookoliš unutar stanica (Poljsak i sur., 2013; Das i sur., 2012).

Izloženost raznim okolišnim stresorima, toksikantima i nepovoljnim uvjetima organizme dovodi u stanje oksidacijskog stresa kada količina reaktivnih vrsta i slobodnih radikala nadmašuje antioksidacijski kapacitet, a biološke makromolekule, najviše lipidi, DNA i proteini, postaju izložene oksidacijskom oštećenju. Učestali oksidacijski stres dovodi do oštećenja membrana, proteina i gena te ubrzanog starenja i nastanka bolesti i posljedično smrti stanica (Marrocco i sur., 2017; Poljsak i sur., 2013).

Mjerenjem oksidacijskog stresa u sustavima *in vivo* možemo izvesti zaključke o okolišnim uvjetima u kojem određena vrsta živi, ispitivati učinke raznih kemikalija, lijekova i suplemenata te promatrati razvoj bolesti (Samet i sur., 2018). Također je neizostavan parametar prilikom stvaranja transgeničnih organizama otpornih na okolišni stres radi dobivanja proizvoda bolje kvalitete (Caverzan i sur., 2016).

Postoji mnogo metoda kojima se može mjeriti oksidacijski stres od kojih će u ovom radu biti navedene samo neke, s naglaskom na najvažnije antioksidacijske enzime koji se koriste kao biomarkeri oksidacijskog stresa.

## 2. OKSIDACIJSKI STRES

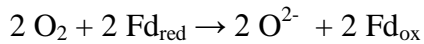
Oksidacijski stres je odstupanje od redoks ravnoteže, u smjeru nastanka povećane količine prooksidansa. Može nastati zbog povećane koncentracije endogenih ili egzogenih reaktivnih vrsta ili uslijed smanjene aktivnosti obrambenih mehanizama i mehanizama popravka same stanice (Poljsak i sur., 2013). Od reaktivnih vrsta koje uzrokuju oksidacijski stres u najvećoj mjeri nastaju reaktivne kisikove vrste (ROS) i reaktivne dušikove vrste (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) (Marrocco i sur., 2017; Poljsak i sur., 2013).

### 2.1 Reaktivne vrste i slobodni radikali

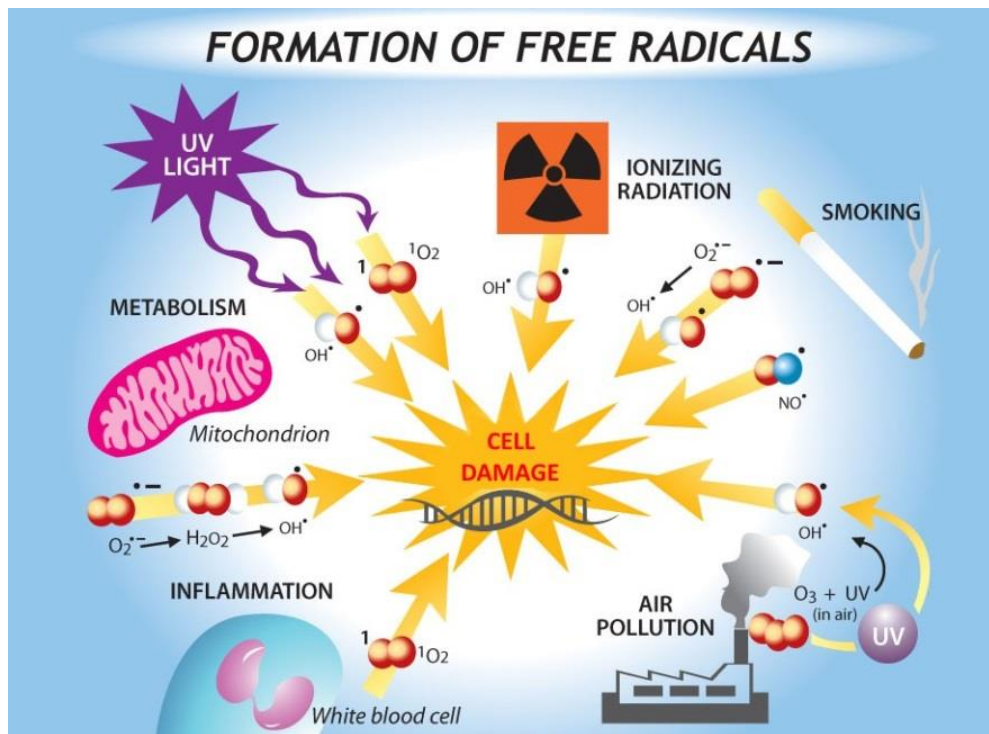
Slobodni radikali su molekule s jednim nesparenim elektronom u vanjskoj elektronskoj ljusci, zbog kojeg su visoko reaktivne i nisko specifične za reaktante. Kako bi postigle elektronsku stabilnost reagiraju sa susjednim molekulama uzimajući njihov elektron i stvarajući novi slobodni radikal. Time mijenjaju svojstva i strukturu molekula s kojima reagiraju, uzrokujući oštećenja na staničnoj i tkivnoj razini (Parčetić i sur., 2016). Najčešće promjene uključuju: dezintegraciju membrana putem lomova lanaca masnih kiselina molekula fosfolipida, što dovodi do poremećaja u transportu, modifikacije aminokiselina i fragmentacije peptida, a to uzrokuje inaktivaciju enzima i povećanu proteolizu te modifikacije nukleotida i lomove na molekuli DNA. Time dolazi do povećane stope mutacija, kromosomskih aberacija te naposljetku smrti stanice, ubrzanog starenja i razvoja bolesti (Caverzan i sur., 2016).

Primarni slobodni radikali koji nastaju u stanicama su superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) i dušikov (II) oksid (NO). Zbog oksidacijskog metabolizma najveći izvor ROS-a su mitohondriji u kojima  $O_2^{\cdot-}$  nastaje prilikom nepotpune redukcije kisika u oksidacijskoj fosforilaciji (Rahal i sur., 2014). Slično se događa i u kloroplastu u uvjetima prezasićenosti svjetlosnom energijom kada se zbog nedostatka  $NADP^+$  reducira  $O_2$  (Mehlerova reakcija) (Sharma i sur., 2014). Nastali  $O_2^{\cdot-}$  može spontano ili djelovanjem enzima prijeći u  $H_2O_2$  koji nije slobodni radikal, ali je snažan oksidans i u većim koncentracijama odgovoran za inaktivaciju mnogih enzima, osim toga može brzo difundirati kroz membrane i biti konvertiran u druge slobodne radikale (Samet i sur., 2018; Poljsak i sur., 2010).

Mehlerova reakcija (Das i sur., 2012) :



Osim u oksidacijskoj fosforilaciji ROS nastaju tijekom razgradnje masnih kiselina, fotosinteze, fotorespiracije, povećane mišićne aktivnosti i u upalnim procesima kao dio obrambenog mehanizma imunološkog sustava (Caverzan i sur., 2016; Marrocco i sur., 2017).



**Slika 1.** Načini nastanka slobodnih radikala (preuzeto sa <http://www.brandeis.edu/>).

U fiziološkim uvjetima redoks ravnoteža je pomaknuta blago u stranu prooksidansa, promovirajući blagi oksidacijski stres (Poljsak i sur., 2013). To je zato jer reaktivne vrste, posebice NO i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , služe kao važne signalne molekule. NO nastaje djelovanjem enzima NO-sintaze i ima važnu ulogu u vazodilataciji i prijenosu živčanih impulsa, dok  $\text{H}_2\text{O}_2$  ima ulogu sekundarnog glasnika putem djelovanja na oksidaciju tiolnih skupina raznih regulatornih proteina, npr. tioredoksina (Rahal i sur., 2014). U biljkama su ROS vrlo važni prijenosnici signala tijekom abiotičkog stresa uslijed ekstremnih temperatura, suše, povećanog saliniteta i dr. Npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$  je izrazito važan u vodnom stresu, gdje preko apscizinske kiseline djeluje na zatvaranje stanica zapornica (Sharma i sur., 2014).

$O^{2-}$  je važno „oružje“ fagocitirajućih leukocita koji razaraju patogene tijekom upalnih procesa. No, u velikim koncentracijama ove molekule postaju toksične ili se pretvaraju u slobodne radikale: NO u prisustvu  $O^{2-}$  daje visoko reaktivni peroksinitratni anion ( $ONOO^-$ ), a  $H_2O_2$  u prisustvu prijelaznih metala (npr. željeza i bakra) najsnažniji poznati slobodni radikal koji svojom toksičnošću nadmašuje djelovanje svih radikala zajedno; hidroksilni anion ( $OH^-$ ) (Fentonova reakcija), dok je  $O^{2-}$  sam po sebi vrlo toksičan, ali je ograničen na odjeljak u kojem se nalazi (Rahal i sur., 2014; Poljsak i sur., 2010).

Fentonova reakcija (Poljsak i sur., 2010):

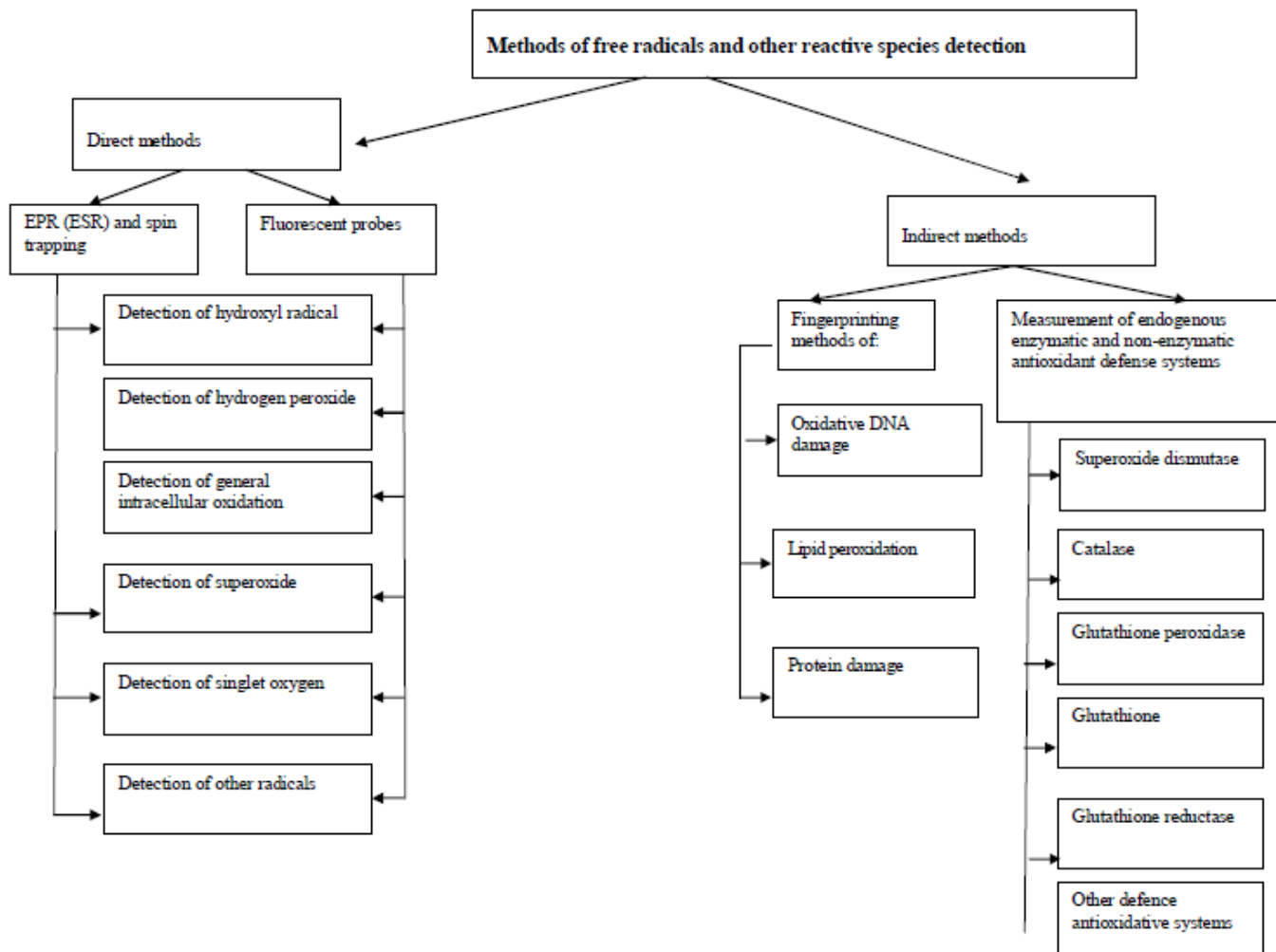


Razni okolišni čimbenici kao što su ozon, zagađenje pesticidima, teškim metalima, UV i ionizirajuće zračenje uzrokuju povećanu produkciju slobodnih radikala (Slika 1) (Samet i sur., 2018).

Osim reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta postoje i reaktivne željezne, bakrene i sumporne vrste (Poljsak i sur., 2013).

### 3. BIOMARKERI OKSIDACIJSKOG STRESA

Spomenuto je da razni zagađivači, zračenje, stres uzrokovan nepovoljnim okolišnim faktorima i nezdrave prehrambene navike uzrokuju povećani oksidacijski stres (Slika 1). Zbog toga se njegovim mjerenjem dobivaju korisne informacije o statusu organizma. U području ekotoksikologije, određivanje razine oksidacijskog stresa je dobar pokazatelj životnih uvjeta u ekosustavima, a također se koristi za ispitivanje toksičnosti kemikalija kao što su pesticidi, umjetna gnojiva i razni ksenobiotici. U genetičkom inženjerstvu mjerenje oksidacijskog stresa neizostavan je parametar pri proizvodnji genetički modificiranih biljaka i životinja koje daju prehrambene proizvode veće kvalitete, dok se u medicini koristi za otkrivanje i praćenje patoloških procesa te ispitivanje lijekova i dodataka prehrani (Caverzan i sur., 2016; Marrocco i sur., 2017).



**Slika 2:** Metode određivanja slobodnih radikala i detekcije drugih reaktivnih vrsta (Preuzeto iz Poljsak i sur., 2010).

Postoje direktne i indirektne metode detekcije i kvantifikacije slobodnih radikala i prooksidansa (Slika 2.) Direktne metode podrazumijevaju mjerenje količine ROS-a, što je vrlo zahtjevno jer slobodni radikali imaju vrlo kratak poluživot. Jedina metoda je mjerenje rezonancije elektronskog spina koja je primjenjiva samo u uvjetima *in vitro*. Zbog toga se koriste indirektne metode koje mjere promjene u aktivnosti ili količini antioksidacijskih komponenti ili metode koje mjere količinu produkata nastalih oštećenjem biomolekula zbog čega se nazivaju metode otiska prsta (Poljsak i sur., 2010).

Biomarkeri su mjerljivi pokazatelji nekog procesa koji omogućuju njegovu kvantifikaciju. Dobar biomarker mora imati mjerno svojstvo koje se povećava prilikom povećanja oksidacijskog stresa, mora biti stabilan i lako dostupan te se u odsutnosti oksidacijskog stresa ne smije mijenjati (Marrocco i sur., 2017; Poljsak i sur., 2013).

Kao biomarker oksidacijskog stresa najčešće se koristi produkt lipidne peroksidacije, malondialdehid (MDA) (Marrocco i sur., 2017; Poljsak i sur., 2010). Naime, polinezasićene masne kiseline, koje su sastavni dio fosfolipida, posebno su podložne oksidaciji zbog velikog broja dvostrukih veza u lancima masnih kiselina. Radikali  $O^{\cdot-}$  i  $OH^{\cdot}$  reagiraju s metilenskim skupinama u područjima dvostrukih veza stvarajući konjugirane diene, lipidne peroksil radikale i hidroperokside koji dalje propagiraju lančane reakcije. U prisustvu prijelaznih metala lipidni hidroperoksidi stvaraju aldehide (npr. MDA), alkene i alkenale, koji reagiraju sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) dajući ružičasti talog koji se lako može mjeriti kolorimetrijski i fluorimetrijski (Marrocco i sur., 2017; Poljsak i sur., 2013).

Reakcijom slobodnih radikala, posebice  $OH^{\cdot}$ , s molekulom DNA dolazi do modifikacije dušičnih baza, oksidacije nukleotida, jednolančanih i dvolančanih lomova te stvaranja adukata DNA. Najčešći produkt koji se koristi kao biomarker oksidacijskog stresa, je oksidirani nukleotid 7,8-dihidroksi-8-okso-2'-deoksigvanozin (8oxodG), koji se aktivno izlučuje iz stanice i može se detektirati u izvanstaničnim tekućinama pomoću testa ELISA (eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Marrocco i sur., 2017). Oksidirane baze mogu se detektirati kromatografskim tehnikama, jednolančani lomovi i unakrsne veze metodom alkalne elucije, a Comet testom se mogu detektirati jednolančani i dvolančani lomovi, njihov omjer te stanice u apoptozi (Poljsak i sur., 2010; Marrocco i sur., 2017).

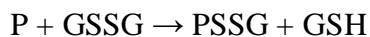
Reakcija ROS-a s proteinima također daje karakteristične i mjerljive produkte. Tiolne skupine cisteina su posebno osjetljive na oksidaciju i najčešća su mjesta interakcije sa ROS. Promjene uključuju nitrozilaciju, karbonilaciju, stvaranje disulfidnih veza i glutationilaciju. Od svih promjena najčešće se mjeri karbonilacija proteina tj. nastanak proteinskih karbonila, spektrofotometrijski uz reagens 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) (Marrocco i sur., 2017).



Nadalje, disulfidni mostovi se mogu detektirati natrijevom dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforezom, (eng. *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), a S-glutationilacija imunološkim tehnikama kao što su ELISA i *Western blotting*. (Marrocco i sur., 2017)

Glutationilacija proteina je rezultat antioksidacijske aktivnosti i na taj način se sprječavaju ireverzibilne modifikacije proteina. (Marrocco i sur., 2017).

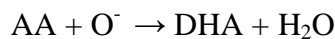
S-glutationacija proteina (Marrocco i sur., 2017):



P - protein, GSSG - oksidirani glutation, odnosno dvije molekule glutaciona spojene disulfidnim vezama, PSSG - spoj proteina i glutaciona preko disulfidne veze, GSH reducirani glutation

Među neenzimskim antioksidansima su molekule sa sposobnošću reverzibilne oksidacije koje mogu direktno sudjelovati u detoksifikaciji reaktivnih vrsta i slobodnih radikala (eng. *scavengers*) ili reducirati supstrate za antioksidacijske enzime (Caverzan i sur., 2016; Poljsak i sur., 2010). To su glutation (GSH) i askorbatna kiselina (vitamin C), kao najvažniji stanični redoks sustavi, te tioredoksin, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), albumin, urinska kiselina (UA), vitamin E (tokoferol), karotenoidi, flavonoidi itd (Sharma i sur., 2014; Poljsak i sur., 2013). U životinja, neenzimatski antioksidansi su posebice važni u izvanstaničnim tekućinama (Marrocco i sur., 2017).

Reverzibilna oksidacija askorbatne kiseline putem koje se održavaju reducirajući uvjeti unutar stanice (Das i sur., 2012):



AA - askorbatna kiselina (eng. *ascorbic acid*), DHA - dehidroaskorbatna kiselina (eng. *dehydroascorbic acid*)

Metode koje mjere količine antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa uključuju mjerenje enzimске aktivnosti spektrofotometrijom i mjerenje ekspresije

antioksidansa na razini transkriptoma i proteoma molekularnim metodama kao što su *Northern blotting*, lančana reakcija reverznom transkriptazom (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), dvodimenzionalna elektroforeza, (2DE), DNA microarray itd. (Poljsak i sur., 2010).

## 4. ANTIOKSIDACIJSKI ENZIMI

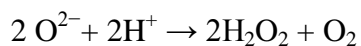
Antioksidacijski enzimi su najvažniji „borci“ protiv viška reaktivnih vrsta na staničnoj razini bilo da djeluju direktno na njihovu degradaciju ili putem regeneracije neenzimskih antioksidansa (Caverzan i sur., 2016).

Kako se njihova aktivnost generalno povećava tijekom oksidacijskog stresa, oni, uz MDA, predstavljaju najvažnije biomarkere oksidacijskog stresa jer se uz uporabu prikladnih supstrata može spektrofotometrijski lako izmjeriti enzimska aktivnost (Poljsak i sur., 2010).

Najvažniji antioksidacijski enzimi zajednički većini aerobnih organizmima su superoksid dismutaza (eng. *superoxide dismutase*, SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (eng. *catalase*, CAT, EC 1.11.1.6) i glutation-ovisni enzimi: glutation peroksidaza (eng. *glutathione peroxidase*, GPX, EC 1.11.1.9), glutation reduktaza (eng. *glutathione reductase*, GR, EC 1.8.1.7) i glutation S-transferaza (eng. *glutathione S-transferase*, GST, EC 2.5.1.18) (Marrocco i sur., 2017).

### 4.1 Superoksid dismutaza (SOD)

SOD su enzimi koji kataliziraju dismutaciju (disproporcionaciju) superoksidnog aniona u molekularni kisik i vodikov peroksid prema slijedećoj jednažbi (Das i sur., 2012):



Pripadaju skupini metaloenzima što znači da koriste metalne ione kao kofaktore. U eukariota postoji nekoliko izoformi koje se razlikuju po vrsti metalnog kofaktora i lokalizaciji u stanici. Kako SOD predstavljaju prvu liniju obrane, lokalizirane su na mjestima najveće produkcije  $\text{O}_2^-$ : u mitohondrijima (Mn-SOD), u kloroplastu (Fe-SOD), u citosolu te u manjim količinama u peroksisomima i izvan stanice (Cu/Zn-SOD) (Marrocco i sur., 2017; Sharma i sur., 2014).

Konstanta reakcije citosolne i mitohondrijske SOD je  $K \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , što upućuje na visoku aktivnost i prema tome veliku važnost u obrani od  $\text{O}^{2-}$ , iako im aktivnost ovisi o zalihama metalnih iona u stanici odnosno tkivu (Rahal i sur., 2014).

Katalitički mehanizam na primjeru citosolne Cu/Zn-SOD (Siraki i sur., 2018):

1.  $\text{Cu}^{2+}\text{-SOD} + \text{O}^{2-} \rightarrow \text{Cu}^+\text{-SOD} + \text{O}_2$
2.  $\text{Cu}^+\text{-SOD} + \text{O}^{2-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}\text{-SOD} + \text{H}_2\text{O}_2$

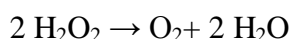
Citosolna Cu/Zn SOD je homodimer i veže dva metalna iona; Zn stabilizira histidinski ogranak u aktivnom mjestu, a Cu je odgovoran za prijenos elektrona s jedne molekule  $\text{H}_2\text{O}_2$  na drugu (Lumb, 2017). Generalno, u prvom se koraku  $\text{O}^{2-}$  oksidira, uz redukciju metalnog iona, a u drugom se  $\text{O}^{2-}$  reducira, uz oksidaciju metalnog iona (Siraki i sur., 2018).

Iako smanjuju količine  $\text{O}^{2-}$ , SOD proizvode  $\text{H}_2\text{O}_2$  pa je za kompletnu detoksifikaciju potrebno djelovanje enzima koji razgrađuju  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao što su CAT ili GPX (Marrocco i sur., 2017). Povećana, ali i smanjena aktivnost SOD može ukazivati na različite patološke procese pa se kao biomarker koristi u medicini za praćenje i dijagnosticiranje bolesti. Npr. za vrijeme upale nastaje puno  $\text{O}^{2-}$  pa se u upalnim tkivima eksprimira više SOD (Marrocco i sur., 2017). Povećana aktivnost SOD u biljakama indikator je pojave oksidacijskog stresa nastalog zbog abiotičkog stresa, kao što su suša i zagađenje teškim metalima, kojima su biljke izložene (Sharma i sur., 2014).

Njezina aktivnost se može mjeriti kolorimetrijski koristeći tetrazolijeve soli kao supstrat (Marrocco i sur., 2017).

## 4.2 Katalaza (CAT)

Katalaza je enzim koji katalizira disproporcionaciju vodikovog peroksida u kisik i vodu prema jednadžbi (Das i sur., 2012):

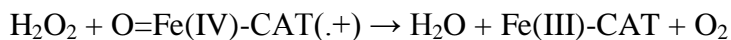
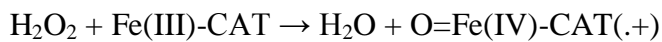


CAT se najčešće nalaze u peroksisomima, koji su mjesto najveće produkcije  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Siraki i sur., 2018; Đorđević, 2004). Osim u peroksisomima, mogu se naći u mitohondrijima,

kloroplastu, citosolu i izvan stanice kao slobodni ili enzimi vezani za membranu (Đorđević, 2004; Sharma i sur., 2014).

Katalaze eukariota su homotetramerni enzimi sa hem skupinama u aktivnom mjestu. Hem skupina u katalazi, za razliku od one u hemoglobinu, sadrži željezo u stabilnijem, feri obliku ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Predloženi mehanizam reakcije CAT (Boon i sur., 2007):



gdje .+ predstavlja prisutnost radikalnog kationa

Mehanizam reakcije CAT također se odvija u dva koraka: u prvom se koraku  $\text{H}_2\text{O}_2$  reducira do vode, uz oksidaciju željeza; a u drugom se  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidira do kisika, uz redukciju željeza unutar hem skupine.

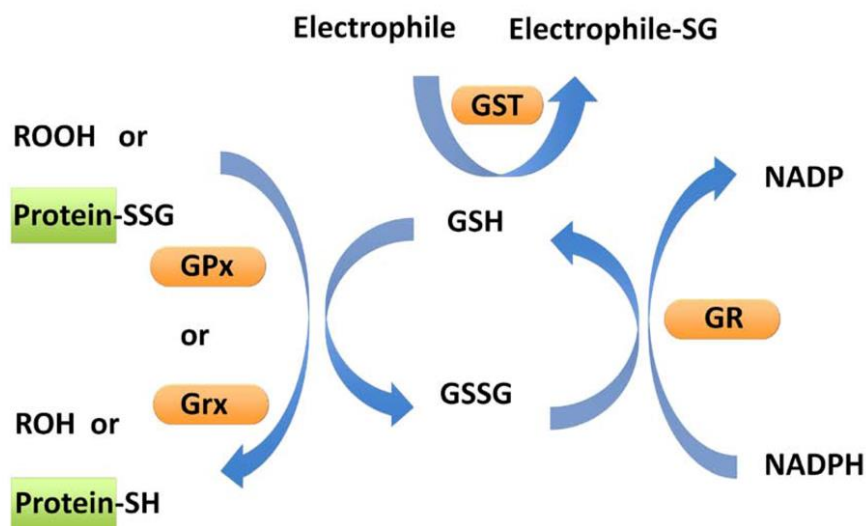
Pri niskim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$  i u prisutnosti malih elektron donora (alkoholi, nitrati, formijati) katalaza može djelovati i kao peroksidaza, katalizirajući oksidaciju jedne molekule  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a da pri tome ne interferira sa signalnim molekulama  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Đorđević, 2004).

Blagi oksidacijski stres povećava ekspresiju i aktivnost CAT, ali višak  $\text{O}_2^-$  ju može inhibirati, stoga njena aktivnost ovisi o vrsti tkiva i procesa. Primjerice, povećana aktivnost u ljudi i životinja karakteristična je za bolesti jetre, gušterače i hemolitičke, bolesti dok je smanjena aktivnost zapažena u bolesnika s malignim bolestima i dijabetesom (Đorđević, 2004). U biljkama aktivnost CAT također ovisi o vrsti stresa. Istraživanja su pokazala da mutante duhana (*Nicotiana tabacum*) s nadeksprimiranim genima za katalazu bolje podnose stres uzrokovan zagađenjem teškim metalima, ali ne i temperaturni stres (Sharma i sur., 2014).

Aktivnost katalaze se može mjeriti pomoću nekoliko kolorimetrijskih i spektrofotometrijskih testova (Marrocco i sur., 2017).

### 4.3 Glutation-ovisni enzimi

Glutation ( $\gamma$ -glutamil-cisteinilglicin, GSH) je tripeptid aminokiselinskog sastava Glu-Cys-Gly i predstavlja najvažniji sustav za održavanje redoks ravnoteže u stanicama svih eukariota i nekih prokariota. Neutralizacija ROS-a omogućena je reverzibilnom oksidacijom tiolnih grupa u disulfidne mostove. GSH se nalazi u citosolu u milimolarnim koncentracijama, dok ga u izvanstaničnoj tekućini ima znatno manje. Omjer reduciranog (GSH) i oksidiranog oblika (GSSG) u uvjetima homeostaze je 30:1 do 100:1 zahvaljujući djelovanju enzima koji sintetiziraju, transportiraju, održavaju i reguliraju GSH (Slika 3) (Samet i sur., 2018). Mjerenje koncentracije reduciranog i oksidiranog oblika te njihovih omjera u krvi i tkivnim homogenatima korisno je kod dijagnosticiranja bolesti i praćenja redoks statusa organizma, iako sam GSH nije prikladan biomarker oksidacijskog stresa zbog toga što stopa njegove sinteze ovisi o dostupnosti cisteina i prilikom metoda determinacije dolazi do razvoja artefakata (Marrocco i sur., 2017). Zbog toga se za praćenje nastanka oksidacijskog stresa koristi mjerenje aktivnosti GSH-ovisnih enzima; glutation peroksidaze (GPX), glutation reduktaze (GR) i posebice glutation-S-transferaze (GST).



**Slika 3:** Održavanje ciklusa GSH (<http://www.mdpi.com/2072-6643/4/10/1399/htm>)

GST - glutation S-transferaza, GPx - glutation peroksidaza, GR - glutation reduktaza, GRx - glutaredoksin, GSH - reducirani glutation, GSSG - oksidirani glutation, ROOH - peroksid, ROH - alkohol, Protein-SSG - glutationirani protein, Protein-SH - reducirani protein, Elektrofil-SG - glutationirani elektrofil, NADPH - reducirani NADP

### 4.3.1 Glutation peroksidaza (GPX) i glutation reduktaza (GR)

Glutation peroksidaze su grupa enzima koji kataliziraju redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u vodu i kisik na račun oksidacije glutationa. Za razliku od CAT, GPX mogu reducirati i organske perokside nastale oštećenjem membrana, u alkohole i kisik (Tabet i sur., 2007). Enzimi su tetramerni i sadrže selenocistein, odnosno cistein u aktivnom mjestu. Okarakterizirano je nekoliko tkivno-specifičnih izoformi u biljaka i životinja (Marrocco i sur., 2017; Bela i sur., 2015). Ovdje je prikazana jednadžba reakcije GPX1, citosolne izoforme.

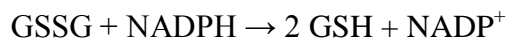
Reakcija koju kataliziraju GPX (Bela i sur., 2015):



ROOH - opća formula za peroksid, ROH - alkohol

Izoforma GPX3 nalazi se u krvi kralježnjaka gdje sprečava oksidaciju hemoglobina (Tabet i sur., 2007; Zachara, 2015). Neke biljne izoforme mogu kao supstrat koristiti proteine koji sadrže tiolne skupine (npr. feredoksin), što ukazuje na to da su osim u detoksifikaciju peroksida uključene i u održavanje redoks ravnoteže djelujući na omjer tiol/disulfida i NADPH/NADP<sup>+</sup> (Bela i sur., 2015).

Glutation oksidiran djelovanjem GPX ili direktnom reakcijom sa prooksidansima vraća se u reducirani oblik djelovanjem GR koja koristi NADPH kao reducens (Sharma i sur., 2014; Das i sur., 2012):



Enzim GR je dimer koji sadrži flavinsku skupinu, najčešće u obliku flavin adenin dinukleotida (FAD) (Fagan i sur., 2010), a nalazi se u citosolu, mitohondrijima, kloroplastima i peroksisomima. Njena važna funkcija poduprta je činjenicom da je samo jedan gen koji kodira za GR evolucijski konzerviran u bakterija, kvasaca i životinja, dok biljke imaju 2 gena za GR (Tabet i sur., 2007; Bela i sur., 2015).

Aktivnost GPX mjeri se koristeći kumenski hidroksiperoksid kao supstrat. Nastali GSSG se vraća u GSH djelovanjem GR uz oksidaciju NADPH koja se može pratiti

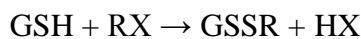
spektrofotometrijski. Pad apsorbancije proporcionalan je aktivnosti GPX. Na sličan način mjeri se i aktivnost GR, uz GSH i NADPH kao supstrate (Marrocco i sur., 2017).

#### 4.3.2. Glutation-S-transferaza (GST)

Transferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina s jedne molekule na drugu (Hacker i sur., 2009).

Glutation-S-transferaza (GST) je biotransformacijski enzim koji reaktivne elektrofile i hidrofobne tvari, opasne za stanične makromolekule, konjugira sa glutationom i čini stabilnijima i bolje topivim te time olakšava njihovo izlučivanje iz organizma. Supstrat za GST mogu biti egzogene, strane tvari (ksenobiotici) kao što su herbicidi, pesticidi, zagađivači iz zraka i vode ili endogeni produkti oksidacijskog metabolizma kao što su lipidni peroksidi i aldehidni derivati (Moden i sur., 2014). U eukariota postoje 3 skupine enzima GST koji su prema smještaju u stanici podijeljeni na: citosolne, mitohondrijske i mikrosomalne GST, vezane za membranu endoplazmatskog retikuluma (Franklin, 2007).

Reakcija koju katalizira GST (Hacker i sur., 2009):



RX - elektrofilni supstrat, GSSR - konjugat glutationa i supstrata

Zbog afiniteta GST prema različitim ksenobioticima organizmi su razvili rezistenciju na herbicide, insecticide i lijekove (Moden i sur., 2014). Različiti supstrati za GST uključuju nitroglicerol, alfatoksine, toksine sveprisutne plijesni roda *Aspergillus*, diklorodifeniltrikloretan (DDT, jedan od prvih insekticida) i 4-hidroksinonenal (4-HNE), produkt lipidne peroksidacije (Hacker i sur., 2009).

Za razliku od ostalih antioksidacijskih enzima, GST nije uključena u direktnu neutralizaciju slobodnih radikala i reaktivnih vrsta. Mjerenjem njene aktivnosti možemo saznati je li oksidacijski stres posljedica izloženosti toksičnim kemikalijama ili posljedica druge vrste stresa (npr. temperaturni, stres zbog nedostatka vode ili hrane itd.).

Jedna od metoda određivanja enzimске aktivnosti se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju produkta koji nastaje u reakciji sa 1-klor-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) (prema protokolu Habig i sur., 1974.)

## 5. LITERATURA

- Caverzan A., Casassola A., Patussi Brammer S.: **Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress**, Intech (2016) DOI: 10.5772/61368
- Marrocco I., Altieri F., Peluso I.: **Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans**, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, (2017) 2017.
- Samet J., Wages P.: **Oxidative stress from environmental exposures**, Current Opinion in Toxicology (2018) 7, 60-66
- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K.: **Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay**, BioMed Research International (2014) 2014. Article ID 956792
- Poljsak B., Šuput D., Milisav I.: **Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use synthetic antioxidants**, Oxidative Medicine and Cellular Longevity (2013) 2013. Article ID 761264
- Poljsak B., Jamnik P.: **Methodology for oxidative state detection in biological systems**, Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects, Cell Biology Research Progress Series (2010)
- Parčetić Kostelac I., Bešlo D., Šperanda M., Kopačin T., Jozinović A., Jović T., Đidara M.: **Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja**, Stočarstvo (2016) 70:2016 (2), 71-92
- Das K., Roychoudhury A.: **Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants**, Frontiers in Environmental Science (2014) 2, 53
- Sharma P., Bhushan A., Shanker Dubey R., Pessarakli M.: **Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions**, Hindawi Publishing Corporation, Journal of Botany (2012) 2012, 26
- Lumb A. B.: **Oxygen toxicity and hyperoxia**, Nunn's Applied Respiratory Physiology (8<sup>th</sup> edition) (2017) 24, 341-356
- Siraki A. G., Klotz L. O., Kehrer J. P.: **Free radicals and reactive oxygen species**, Comprehensive Toxicology (2018) 1, 262-294
- Djordjević V. B.: **Free radicals in cell biology**, International Review of Cytology (2004) 237, 57-89



- Tabet F., Touyz R. M.: **Reactive oxygen species, oxidative stress and vascular biology in hypertension**, Comprehensive Hypertension (2007) 30, 337-347
- Zachara B. A.: **Selenium and selenium-dependent antioxidants in chronic kidney disease**, Advances in Clinical Chemistry (2015) 68, 131-151
- Bela K., Horváth E., Gallé I., Szabados L., Tari I., Csiszár J.: **Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses**, Journal of plant physiology (2015) 176, 192-201
- Fagan R. L., Palfey B. A.: **Flavin-dependent enzymes**, Comprehensive Natural Products II (2010) 7, 37-113
- Modén O., Mannervik B.: **Glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine**, Advances in Cancer Research (2014) 122:6, 199-204
- Franklin M. R.: **Phase II biotransformation reactions: glutathione-s-transferase**, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference (2007) 1-8
- Hacker M., Bachmann K., Messer W.: **Pharmacology: Principles and practise** (2009) 166-167
- Boon E. M., Downs A., Marcey D.: **Proposed mechanism of catalase**. Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidoreductase, Catalase Structural Tutorial (2007)
- [www.blogs.brandeis.edu](http://www.blogs.brandeis.edu)
- [www.mdpi.com](http://www.mdpi.com)

## 6. SAŽETAK

Oksidacijski stres je u današnje vrijeme vrlo popularna tema budući da smo okruženi raznim okolišnim zagađivačima, kemikalijama i stresnom načinu života. Također je sve važniji zbog velike korelacije sa razvojem bolesti i ubrzanim starenjem. Osim u medicini važan je u okolišnim istraživanjima za ispitivanje kemikalija i ksenobiotika koristeći testne organizme i u genetičkom inženjerstvu za proizvodnju transgeničnih organizama otpornih na stres. Zbog toga je potrebno moći precizno izmjeriti razinu oksidacijskog stresa u organizmu. Dok su direktne metode koje mjere koncentraciju slobodnih radikala ograničene samo na uvjete *in vitro* postoje brojne indirektno metode koje mjere aktivnost Najvažniji biomarkeri oksidacijskog stresa su količina MDA te aktivnosti enzima SOD i GPX. Međutim, za potpunu sliku je najbolje koristiti nekoliko različitih parametara koji daju uvid u potpuni redoks status organizma jer antioksidacijski sustavi djeluju simultano i sinergistički.

## 7. SUMMARY

Today oxidative stress is a very popular subject in science due to pollutants in our environment and stressful way of life. Moreover, it is very important because of great correlation with ageing and disease development. Apart from medicine, oxidative stress is measured in environmental studies using test organisms as indicators of xenobiotic toxicity and in genetic engineering for producing transgenic organisms with improved tolerance to stress. Because of its many uses, it is necessary to precisely measure level of oxidative stress in organisms. While direct methods, which measure concentration of free radicals, function only in *in vitro* conditions, there are plenty of indirect methods which measure antioxidant enzyme activities or by-products of damage by ROS on cellular components. The most reliable biomarkers of oxidative stress are MDA content and SOD and GPX activities. However, for complete insight in redox status it's best to measure many parameters because antioxidant systems work simultaneously and synergistically.