

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



Antioxidační enzymy v srdci

Antioxidative enzymes in heart

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Patricie Balková, PhD.

Lenka Kletečková

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s využitím uvedených literárních zdrojů a s pomocí informací poskytnutých mou školitelkou.

Červenec 2010

Lenka Kletečková

Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Patricii Balkové PhD., Doc. RNDr. Olze Novákové CSc. a veškerým členům laboratoře za jejich trpělivost, čas a pomoc, kterou mi věnovaly při vypracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Elišce Procházkové za její cenné rady a připomínky nejen v oblasti modelování proteinových struktur. Bez její ochoty a podpory by chvíle strávené nad prací byly obtížnější.

Michaele Plecité bych ráda poděkovala za její podnětné poznámky ohledně stylistických a jazykových úprav textu.

Můj velký dík patří také rodině a přátelům, kteří mi byli oporou a motivovali mě.

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin morbidity a mortality ve vyspělých zemích. Zvýšený oxidační stres je spojen s vývojem srdečních chorob. Organismus je proti škodlivému působení volných radikálů chráněn antioxidantními enzymy. Mezi hlavní antioxidantní enzymy jsou řazeny superoxiddismutasy, peroxiredoxiny, glutathionperoxidasy a katalasa. Rešeršní práce je zaměřena na úlohu těchto antioxidantních enzymů v kardiovaskulárním systému. Antioxidantní enzymy zabraňují lipoperoxidaci biologických membrán, inaktivaci proteinů, mutaci DNA a apoptose. Je známo, že antioxidantní enzymy pozitivně ovlivňují homeostasu cévního endotelu, zabraňují vzniku kardiovaskulárních onemocnění a jsou významné svým vlivem na fyziologickou funkci, morfologii a kontraktilitu srdce. Vliv antioxidantních enzymů na kardiovaskulární systém je velice složitý proces a dosud nejsou objasněny všechny aspekty jejich působení. Studium těchto enzymů je důležité pro porozumění mechanismů patofyziologických změn, které probíhají v kardiovaskulárním systému během aterosklerosy, infarktu myokardu, ischemicko-reperfusního poškození a kalcifikace a zúžení cévních chlopní atd.

Klíčová slova:

Kardiovaskulární onemocnění, oxidační stres, antioxidantní enzymy, superoxiddismutasy, peroxiredoxiny, glutathionperoxidasy, katalasa

Abstract

Cardiovascular diseases are one of the most frequently causes of morbidity and mortality in developed countries. An increase of oxidative stress is implicated by progression of heart diseases. Antioxidative enzymes protect the organism against them. The superoxide dismutases, the peroxiredoxins, the glutathione peroxidases and the catalase are advised to be used as the main antioxidative enzymes. The review is focused on the role of these antioxidative enzymes in the cardiovascular system. Antioxidative enzymes prevent the lipoperoxidation of biological membranes, the proteins inactivation, the DNA mutation and the apoptosis. It is well-known, that antioxidative enzymes positively influence a homeostasis of the vascular endothelium, prevent a burst of the cardiovascular disease and they are important for physiological functions, the morphology and the contractility of heart. The effect of antioxidative enzymes on the cardiovascular system is very complicated process and it still has not clarified all aspects of their action. A reseach of these enzymes is essential for understading the mechanisms of pathophysiological changes, which proceed into the cardiovascular system during the atherosclerosis, the myocardial infarction, the ischemic-reperfusion injury of the tissue and the calcification and stenosis of the valves.

Key words:

Cardiovascular diseases, oxidative stress, antioxidative enzymes, superoxide dismutases, peroxiredoxins, glutathione peroxidases, catalase

Seznam použitých zkratek

3-nitro-Tyr - 3-nitro-tyrosin

ApoE - apolipoprotein E

Arg - arginin

Asn - asparagin

Asp - asparagová kyselina

ATP - adenosin-5'-trifosfát

BSO - buthioninsulfoximin

CAT - katalasa

cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina

CoQ - koenzym Q

CoQH₂ - redukovaný koenzym Q

CuZnSOD, SOD1 - cytosolická měď-zinková superoxiddismutasa

CYPs - cytochrom P450 monooxygenasy

Cys - cystein

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DTT - dithiothreitol

EC-SOD, SOD3 - extracelulární měď-zinková superoxiddismutasa

EDHF - endothelium-derived hyperpolarizing factor

eNOS - endoteliální NO synthasy

FAD - flavinadenindinukleotid

FMN - flavinmononukleotid

Gln - glutamin

GPx - glutathionperoxidasy

GPx1 - glutathionperoxidasa 1

HepG2 - buňky lidského hepatocelulárního karcinomu

His - histidin

CHF - chronické srdeční selhání

I/R - ischemicko-reperfuzní

Ile - isoleucin

IPC - ischemický preconditioning

LDL - lipoprotein o nízké hustotě
Leu - leucin
Lys - lysin
MnSOD, SOD2 - manganová superoxiddismutasa
mPHGPx - mitochondriální fosfolipidová hydroperoxidglutathionperoxidasa
NAD⁺ - oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH - redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH - redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
PHGPx, GPx4 – fosfolipidová hydroperoxidglutathionperoxidasa
Prx - peroxiredoxiny
PUFA - polynenasycené mastné kyseliny
RNS - reaktivní formy dusíku
ROS - reaktivní formy kyslíku
Se-Cys - selenocystein
Ser - serin
SOD - superoxiddismutasy
Trp - tryptofan
Trx - thioredoxiny
Tyr - tyrosin
XDH - xanthindehydrogenasa
XO - xanthinoxidasa
XOR - xanthinoxidoreduktasy

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Reaktivní formy kyslíku.....	11
2.1	Radikálové formy ROS.....	11
2.1.1	Superoxid.....	11
2.1.2	Hydroxylový radikál.....	12
2.1.3	Peroxylový radikál.....	12
2.2	Neradikálové formy ROS.....	14
2.2.1	Peroxid vodíku.....	14
2.2.2	Singletový kyslík.....	14
3	Reaktivní formy dusíku.....	14
3.1	Oxid dusnatý a peroxynitrit.....	14
4	Zdroje ROS.....	15
4.1	Mitochondrie.....	15
4.1.1	Komplex I.....	15
4.1.2	Komplex III.....	16
4.2	Xanthinoxidasa.....	16
4.3	NADPH oxidasa.....	17
4.4	Cytochromy P450.....	17
4.5	Endoteliální NO synthasy.....	18
5	Antioxidační enzymy.....	19
5.1	Superoxiddismutasy.....	19
5.1.1	Cytosolická měď-zinková superoxiddismutasa.....	19
5.1.1.1	Struktura CuZnSOD.....	20
5.1.1.2	Reakční mechanismus CuZnSOD.....	20
5.1.1.3	Vliv CuZnSOD na kardiovaskulární systém.....	21
5.1.2	Extracelulární měď-zinková superoxiddismutasa.....	21
5.1.2.1	Struktura a reakční mechanismus EC-SOD.....	22
5.1.2.2	Vliv EC-SOD na kardiovaskulární systém.....	22
5.1.3	Manganová superoxiddismutasa.....	23
5.1.3.1	Struktura MnSOD.....	24
5.1.3.2	Reakční mechanismus MnSOD.....	25

5.1.3.3	Vliv MnSOD na kardiovaskulární systém.....	25
5.2	Peroxiredoxiny.....	26
5.2.1	System savčích Prx.....	26
5.2.2	Struktura Prx.....	27
5.2.3	Enzymatické funkce Prx.....	27
5.2.3.1	Rozklad H ₂ O ₂	27
5.2.3.2	Peroxyinitritreduktasová aktivita.....	28
5.2.4	Vliv Prx na kardiovaskulární systém.....	28
5.3	Glutathionperoxidasy.....	29
5.3.1	Reakční mechanismus GPx obsahujících Se-Cys.....	29
5.3.2	Fosfolipidová hydroperoxidglutathionperoxidasa.....	29
5.3.2.1	Struktura PHGPx.....	30
5.3.2.2	Mitochondriální PHGPx a její vliv na srdce.....	31
5.3.3	Glutathionperoxidasa 1.....	31
5.3.3.1	Vliv GPx1 na kardiovaskulární systém.....	31
5.4	Katalasa.....	32
5.4.1	Struktura monomeru CAT.....	32
5.4.2	Reakční mechanismus CAT.....	33
5.4.3	Vliv CAT na kardiovaskulární systém.....	34
6	Choroby srdce a cév spojené se zvýšeným oxidačním stresem.....	34
6.1	Atherosklerosa.....	35
6.1.1	Role antioxidantních enzymů v atherosklerose.....	36
6.2	Infarkt myokardu.....	37
6.2.1	Role antioxidantních enzymů v akutním infarktu myokardu.....	37
6.3	Ischemicko-reperfusní poškození srdeční tkáně.....	38
6.3.1	Role antioxidantních enzymů v I/R poškození srdeční tkáně.....	38
6.4	Kalcifikace a zúžení chlopní.....	39
7	Závěr.....	39
8	Použitá literatura.....	40

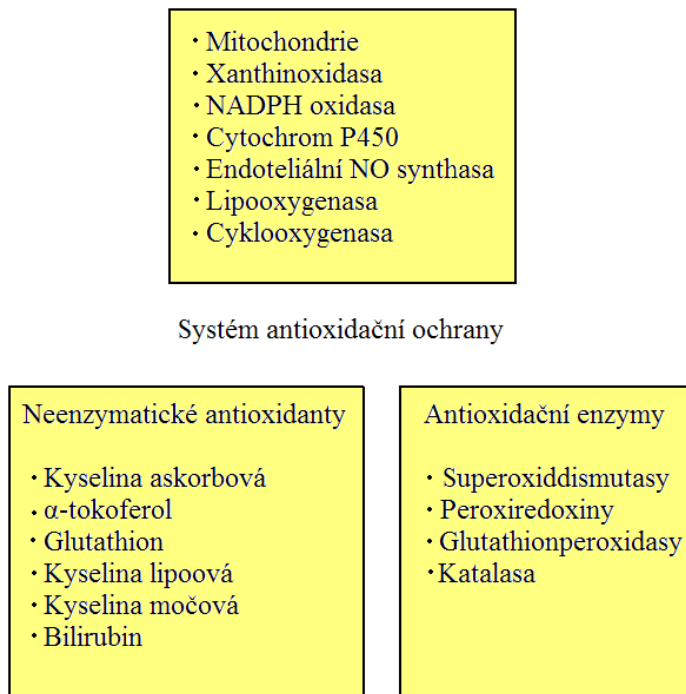
1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích. V posledních letech byla prokázána souvislost mezi kardiovaskulárními chorobami a tzv. oxidačním stresem. Oxidační stres je označován jako nerovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS) a jejich odstraňováním neenzymatickými antioxidanty a antioxidantními enzymy. Díky této skutečnosti jsou antioxidantní enzymy významným objektem výzkumu v mnoha světových laboratořích.

V organismu jsou ROS a RNS produkovány různými zdroji, které se dělí na endogenní a exogenní. Nejvýznamnějšími endogenními zdroji ROS a RNS jsou: mitochondriální dýchací řetězec, NADPH oxidasa, NO syntasa, xanthinoxidasa, cytochrom P450, lipooxygenasa a cyklooxygenasa. Za fyziologických podmínek se ROS a RNS podílejí na likvidaci fagocytovaného mikroorganismu, vasodilataci cév a buněčné signalizaci [1]. Některé formy ROS a RNS jsou volné radikály, tj. částice obsahující právě jeden nepárový elektron. Díky své velké nestabilitě a reaktivitě jsou schopny odjímat elektrony dalším molekulám, a tímto je destabilizovat a následně poškozovat. Radikálové formy ROS a RNS ničí buněčné makromolekuly zejména peroxidací lipidů, inaktivací proteinů a mutací DNA [2].

Buňka má proti těmto škodlivým účinkům ROS a RNS vyvinutý systém antioxidantní ochrany, který transformuje ROS a RNS na méně reaktivní molekuly. K hlavním antioxidantním enzymům se řadí superoxiddismutasy, peroxiredoxiny, glutathionperoxidasy a katalasa. K neenzymatickým antioxidantům patří především kyselina askorbová, α -tokoferol, glutathion, kyselina lipoová, kyselina močová a bilirubin. Endogenní zdroje ROS a RNS a následné rozdělení antioxidantů na enzymatické a neenzymatické je zobrazeno na obr. 1 [1].

Endogenní zdroje ROS a RNS



Obr. 1: Schéma endogenních zdrojů ROS a RNS a systému antioxidační ochrany. Upraveno podle [3].

2 Reaktivní formy kyslíku

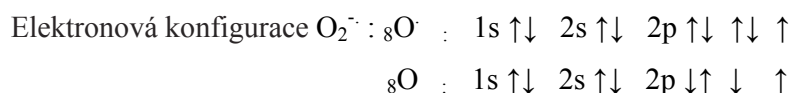
Vzhledem k tomu, že molekulární kyslík je biradikál, je díky svým dvěma nepárovým elektronům velmi reaktivní. V závislosti na počtu přijatých elektronů vznikají jeho různé reaktivní formy ROS, které se dělí na radikálové a neradikálové.

2.1 Radikálové formy ROS

2.1.1 Superoxid

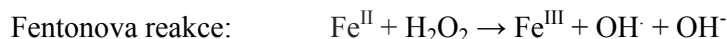
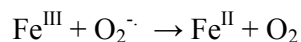
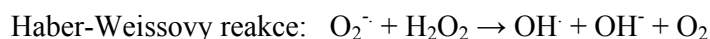
Na základě elektronové konfigurace je superoxid (O_2^-) zároveň radikálem i aniontem. Díky svému náboji není O_2^- schopný procházet přes membrány. V organismu vzniká

jednoelektronovou redukcí O_2 . Největším producentem $O_2^{\cdot-}$ je mitochondriální elektrontransportní řetězec. Pokud není $O_2^{\cdot-}$ v mitochondriích degradován, poškozují proteinové komplexy elektrontransportního řetězce a integritu vnitřní mitochondriální membrány. Po narušení mitochondriálních membrán se $O_2^{\cdot-}$ dostane do cytosolu, kde degraduje další buněčné komponenty. Enzymy, které chrání buňku před zvýšenou koncentrací $O_2^{\cdot-}$ se nazývají superoxiddismutasy [4].



2.1.2 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) je nejvíce reaktivní forma ROS. Má velmi nestabilní elektronovou konfiguraci a poločas rozpadu v řádu nanosekund. Díky své velké nestabilitě OH^{\cdot} poškozují biomakromolekuly, zejména lipidy, proteiny a DNA. *In vivo* OH^{\cdot} vzniká Haber-Weissovými reakcemi z méně reaktivních $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 za přítomnosti přechodných kovů (Fe, Cu, Co, nebo Ni) s oxidačními čísly II a III. Jednou reakcí z Haber-Weissových kaskád je Fentonova reakce, která vede ke vzniku OH^{\cdot} prostřednictvím rozkladu H_2O_2 za katalýzy Fe s oxidačním číslem II. Ionty přechodných kovů se za běžných podmínek nacházejí např. v caeruloplasminu, transferrinu a ferritinu, a právě $O_2^{\cdot-}$ je může z těchto přenašečů uvolnit [5].

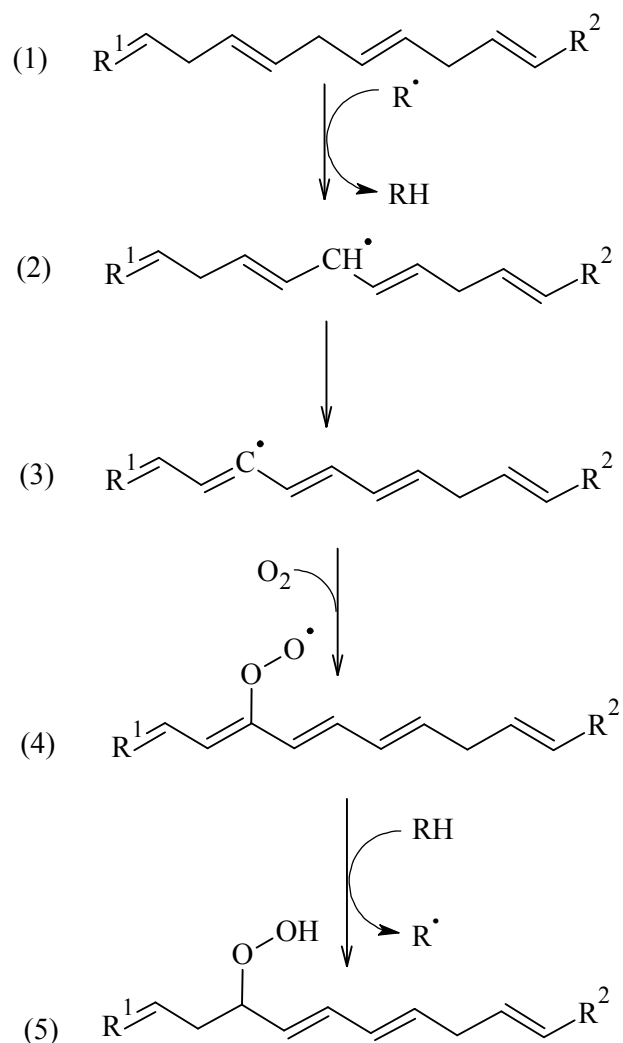


2.1.3 Peroxylový radikál

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) mohou být napadeny volnými radikály (neenzymatická peroxidace) nebo buněčnými enzymy lipooxygenasami a cyklooxygenasami (enzymatická peroxidace). Takovéto napadení PUFA vede ke vzniku peroxylového radikálu (ROO^{\cdot}), jak je popsáno na obr. 2.

Elektrofilní látka R^\cdot atakuje v PUFA (1) $-CH_2-$ skupinu v blízkosti dvojné vazby, které odejme atom vodíku. Dojde k přeskupení elektronů v narušeném uhlovodíkovém řetězci PUFA (2) do formy konjugovaného dienu (3), který snadno reaguje s O_2 za vzniku ROO^\cdot (4). Takto generovaný ROO^\cdot poté slouží jako iniciátor peroxidace dalších molekul PUFA a následně se z něj stává hydroperoxid (5).

Peroxidace lipidů poškozuje architekturu buněčných membrán, které se tak stávají více propustnými, ovlivňuje buněčnou signalizaci a expresi genů.



Obr. 2: Schématické znázornění procesu peroxidace lipidů. Upraveno podle [2].

2.2 Neradikálové formy ROS

2.2.1 Peroxid vodíku

Dvouelektronovou redukcí O_2^- , kterou katalyzují superoxididismutasy, je produkován peroxid vodíku (H_2O_2). Díky nepřítomnosti náboje má H_2O_2 schopnost procházet membránami. Ovlivňuje buněčnou signalizaci a aktivuje transkripční faktory. V přítomnosti tranzitních kovů s oxidačním číslem II vstupuje H_2O_2 do Fentonovy reakce, kterou je produkován velmi reaktivní OH^\cdot [6].

2.2.2 Singletový kyslík

Pokud O_2 v průběhu chemické reakce získá vysokou energii, jeho dva nepárové valenční elektrony změní elektronovou konfiguraci, ve které mají opačný spin. Tato forma se nazývá singletový kyslík (1O_2), který atakuje zejména elektrony dvojných vazeb nacházejících se v PUFA [7].

3 Reaktivní formy dusíku

3.1 Oxid dusnatý a peroxynitrit

Prostřednictvím enzymů NO synthas je generován v organismu oxid dusnatý (NO^\cdot), který prochází membránami a zúčastňuje se buněčné signalizace jako druhý posel. Sloučením NO^\cdot s O_2^- vzniká velmi reaktivní peroxynitrit ($ONOO^\cdot$), který negativně působí na buněčné lipidy, nitruje a hydroxyluje Tyr proteinů, iniciuje peroxidaci lipidů a způsobuje mutace DNA [8].

4 Zdroje ROS

4.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou dvoumembránové organely eukaryotní buňky, ve kterých probíhají převážně katabolické reakce. Na vnitřní mitochondriální membráně se nachází elektrontransportní řetězec, v intermembránovém prostoru dochází k přenosu elektronů na jednotlivé komplexy respiračního systému a vnitřní prostor, který se nazývá matrix, je místem celého energetického metabolismu buňky.

Největším producentem ROS v buňce je mitochondriální elektrontransportní řetězec. Odhaduje se, že přibližně 1-5% O_2 není zcela redukováno a je uvolněno ve formě O_2^- . Tato práce dále popisuje významné mitochondriální zdroje O_2^- , kterými jsou komplexy I a III [9].

Za patofyziologických stavů, např. během ischemicko-reperfusního poškození tkáně, dýchací řetězec generuje nadměrné množství ROS, které má za následek narušení integrity vnitřní mitochondriální membrány. Poškozenou membránou z mitochondrie migrují cytochrom c a Ca^{II} . Jejich následná vysoká koncentrace v cytosolu aktivuje vnitřní signální kaskády vedoucí k apoptose či nekrose buňky [3].

4.1.1 Komplex I

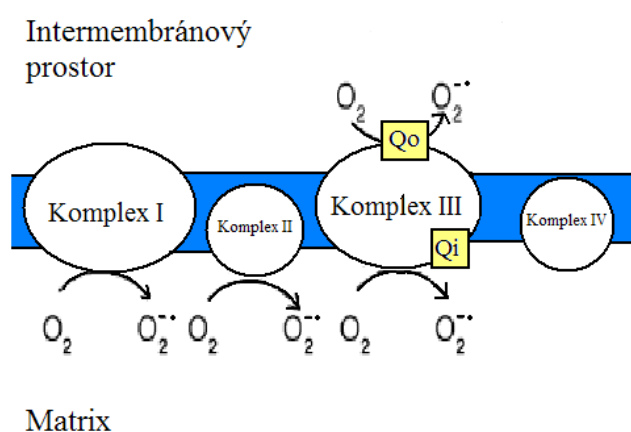
Komplex I (EC 1.6.5.3) slouží k přenosu elektronů z NADH na CoQ (koenzym Q). V hydrofilní části umístěné směrem do matrix se nachází FMN, který přijímá elektrony z NADH. Tok elektronů začíná redukcí FMN, pokračuje přes Fe-S centra, nakonec elektrony přijímá CoQ.

Komplex I produkuje O_2^- dvěma způsoby, v místě zabudování FMN za zvýšené koncentrace NADH v systému NADH/NAD⁺ a během reversního elektronového transportu při velké protonmotivní síle, která vrací elektrony z CoQH₂ (redukováný koenzym Q) zpět do komplexu I. Komplex I generuje O_2^- směrem do matrix, jak je patrné z obr. 3 [9].

4.1.2 Komplex III

Komplex III (EC 1.10.2.2) směřuje tok elektronů z CoQH₂ na cytochrom c. Na komplexu III se nacházejí dvě vazebná místa pro CoQ, Q_o a Q_i, jak je znázorněno na obr. 3. CoQH₂ je oxidován v místě Q_o ve dvoukrokovém procesu, který se nazývá Q-cyklus.

Ke vzniku O₂⁻ dochází během Q-cyklu, kdy je elektron z radikálové formy CoQ semiubichinonu přenesen v místě Q_o na O₂. Uvolňování O₂⁻ je směřované na obě strany mitochondriální membrány, jak je zobrazeno na obr. 3 [10].



Obr. 3: Mitochondriální produkce ROS. Komplexy I a II uvolňují O₂⁻ pouze směrem do mitochondriální matrix. Komplex III generuje O₂⁻ na obě strany vnitřní mitochondriální membrány. Upraveno podle [7].

4.2 Xanthinoxidasa

Xanthinoxidasa se řadí do rodiny enzymů, které se nazývají xanthinoxidoreduktasy (XOR). XOR jsou molybdeno-ferrosulfátové hydroxylasy. Nejvíce se jich nachází ve střevě a játrech, ale jsou přítomny také v endotelu cév a v mozku. Gen kódující XOR existuje ve dvou formách známých jako xanthinoxidasa (XO, EC 1.17.3.2) a xanthindehydrogenasa (XDH, EC 1.17.1.4). XOR se zúčastňují katabolismu purinů, kde transformují hypoxanthin na xanthin, který je dále metabolisován na kyselinu močovou. XDH odjímá elektrony, které jsou přenášeny přes FAD, molybdenový komplex a dvě Fe-S centra na NAD⁺, touto cestou je produkován NADH. Za patofyziologických stavů XDH konvertuje na XO, která neváže NAD⁺ a směřuje tok elektronů na O₂ za vzniku O₂⁻ a H₂O₂. XO se váže na

glykosaminoglykany na povrchu endotelu a nebo se nachází uvnitř endoteliálních buněk. Exprese XO je zvýšena při ischemii, chorobě koronárních arterií a srdečním selhání [2, 11].

4.3 NADPH oxidasa

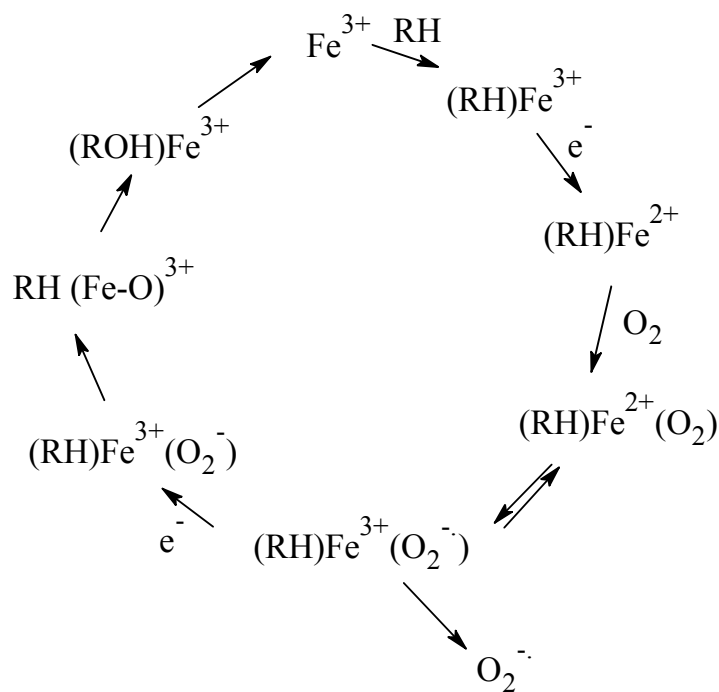
NADPH oxidasa (EC 1.6.1.3) je enzym, který byl poprvé objeven ve fagocytujících neutrofilech. Buňky imunitního systému využívají NADPH oxidasu k likvidaci fagocytovaných mikroorganismů prostřednictvím O_2^- . K produkci O_2^- dochází přenosem elektronů z NADPH na O_2 . Její různé homology jsou exprimovány v endotelu, adventicii a hladké svalovině cév, kde zvyšují koncentraci O_2^- , aniž by bojovaly proti patogenům. Tato skutečnost výrazně přispívá ke zvýšení oxidačního stresu a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění např. choroby koronárních arterií [12, 13].

4.4 Cytochromy P450

Cytochrom P450 monooxygenasy (CYPs, EC 1.14.14.1) jsou rozsáhlou skupinou membránově vázaných hemoproteinů, které zabudovávají atom O do substrátu z molekuly O_2 . Vyskytují se převážně v membráně endoplasmatického retikula. Metabolisují steroidy, arachidonovou kyselinu a vitaminy. Během xenobiochemických procesů se účastní první fáze biotransformace-derivatizace. Katalytický cyklus cytochromu P450 je znázorněn na obr. 4. Přítomný atom Fe pochází z molekuly cytochromu P450, ke kterému přistupuje substrát RH, který je v průběhu cyklu oxidován. V průběhu oxidace dochází k přenosu elektronů mezi atomem Fe enzymu a molekulou O_2 . Během tohoto procesu se O_2 může transformovat na O_2^- , jak je znázorněno na obr. 4 [14].

Většina těchto enzymů se nachází v játrech, kde napomáhají detoxikaci organismu. Isoformy, které se nacházejí v srdci a cévách, jsou při své zvýšené aktivitě zdrojem ROS, které jsou generovány přenosem elektronů na O_2 . Srdce obsahuje zejména tyto formy CYPs: 1A1, 2B6/7, 2C8/19, 2D6 a 2E1. Nejdůležitější pro rozvoj kardiovaskulárních chorob je endoteliální CYP 2C9 [15].

Pokud CYPs inhibujeme chloramfenikolem před a po ischemii, dochází ke sníženému uvolňování O_2^- a redukci velikosti poškození srdeční tkáně [16].



Obr. 4: Katalytický cyklus cytochromu P450 s vyznačeným krokem možného uvolnění O_2^- . Upraveno podle [14].

4.5 Endoteliální NO synthasy

Endoteliální NO synthasy (eNOS, EC 1.14.13.39) produkují NO^\bullet oxidací N^ω -hydroxy-L-argininu na produkty L-citrulin a NO^\bullet . Během vzniku NO^\bullet dochází k štěpení O_2 a jeho redukcí na H_2O . Produkce NO^\bullet je pro organismus důležitá, protože NO^\bullet zprostředkovává vasodilataci cév, zabraňuje adhezi trombocytů a jejich agregaci.

eNOS jsou také zdrojem O_2^- . Ke vzniku O_2^- dochází po oddělení redukcí O_2 od synthesy NO^\bullet (odpřažení eNOS). Během odpřažení eNOS se homodimer eNOS rozpadne na monomery, které nejsou schopny vázat kofaktor tetrahydrobiopterin potřebný pro produkci NO^\bullet . Pokud eNOS nemohou produkovat NO^\bullet , přenáší elektrony na O_2 za vzniku O_2^- . K odpřažení eNOS převážně dochází v případě zvýšení koncentrace ONOO^- ve tkáni i okolí. Tato forma RNS poté oxiduje esenciální tetrahydrobiopterin [17].

5 Antioxidační enzymy

5.1 Superoxiddismutasy

Superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) byly objeveny v 30. letech 20. století. Mann a Keilinem vyizolovali protein vázající měď z hovězí krve a jater a pojmenovali ho erythrocuprein. McCord a Fridovich objasnili enzymatickou funkci erythrocupreinu, spojili ji s redukcí $O_2^{\cdot-}$ a nazvali SOD [18].

SOD chrání buňky a extracelulární komponenty před vlivem $O_2^{\cdot-}$ redukcí dvou molekul $O_2^{\cdot-}$ na méně reaktivní O_2 a H_2O_2 . Na reakci SOD navazují svým účinkem peroxiredoxiny, glutathionperoxidasy a katalasa.

Redukce $O_2^{\cdot-}$ katalyzovaná SOD: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Koncentrace $O_2^{\cdot-}$ je zvýšená u mnoha patologických stavů zahrnujících atherosklerosu, ischemicko-reperfusní poškození srdeční tkáně, infarkt myokardu atd. V lidském srdci a cévním systému se nachází celkem tři isoenzymy SOD, které se liší svou lokalizací v buňce: cytosolická měď-zinková SOD, mitochondriální manganová SOD a extracelulární měď-zinková SOD [19].

5.1.1 Cytosolická měď-zinková superoxiddismutasa

Měď-zinková superoxiddismutasa (CuZnSOD, SOD1) je cytosolický isoenzym SOD, který je výrazně exprimován v endotelu. Primárně se nachází v cytosolu, velké množství CuZnSOD bylo dále pozorováno v lysosomech a nukleoplasmě, v nízké koncentraci se objevuje i v intermembránovém prostoru mitochondrií a peroxisomech. Byla prokázána schopnost protekce cytochromu c před jeho redukcí $O_2^{\cdot-}$ v přítomnosti CuZnSOD, tím byla objasněna její enzymatická funkce [19, 20, 21].

5.1.1.1 Struktura CuZnSOD

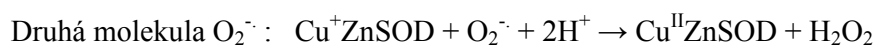
CuZnSOD je homodimer velký přibližně 32 kDa. Každá z podjednotek obsahuje jeden atom Cu a jeden atom Zn. Homodimer je orientován tak, aby aktivní místo jedné podjednotky bylo otočeno na protější stranu podjednotky druhé. Každý monomer je tvořen β -barelem s osmi β -listy a dvěma smyčkami, tzv. elektrostatickou smyčkou a kovy-vázající smyčkou. Kovy-vázající smyčka je nepostradatelná pro správnou funkci enzymu [22].

5.1.1.2 Reakční mechanismus CuZnSOD

Atom Cu s oxidačním číslem II je tetraedricky vázán na His46, 48, 63 a 120. V průběhu katalytického cyklu dojde k jeho redukci na Cu^+ , ve kterém je atom Cu vázán na His46, 48 a 120. Atomy Cu a Zn jsou propojeny imidazolovým kruhem His63. Atom Cu je esenciální pro katalytickou funkci, atom Zn je důležitý pro prostorové uspořádání enzymu [22].

Aktivní místo, jedna z nejméně evolučně konzervovaných oblastí, je tvořeno kladně nabitými aminokyselinami z důvodu zvýšení afinity k O_2^- . V aktivním místě je velmi důležitý Arg143, který tvoří vodíkový můstek s O_2^- . Při jeho nahrazení jinou aminokyselinou (přestože s pozitivním nábojem) např. Lys výrazně klesá aktivita enzymu. Pokud je Arg143 nahrazen neutrální aminokyselinou např. Ile, CuZnSOD ztratí téměř veškerou katalytickou aktivitu [23].

V prvním kroku reakce se O_2^- naváže do aktivního místa přes vodíkové můstky. Elektron je přenesen přes můstky na Cu ($\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{Cu}^+$) a O_2 difunduje ven z enzymu. Následuje změna geometrie aktivního místa z tetraedrické na trigonálně planární. Zruší se spojení Cu a Zn přes imidazolový kruh His63. Cu^+ je oxidován druhou molekulou O_2^- , a tím se regeneruje zpět na Cu s oxidačním číslem II ($\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$) za současného uvolnění H_2O_2 [24].



5.1.1.3 Vliv CuZnSOD na kardiovaskulární systém

CuZnSOD hraje důležitou roli v homeostase cévního endotelu. Endotel produkuje řadu vasodilatátorů, jedním z nich je *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF). Dlouho nebyla známa chemická podstata EDHF. Současné výzkumy ukazují, že by jím mohl být H_2O_2 . Pro potvrzení tohoto faktu byly použity CuZnSOD^{-/-} myši, které byly ovlivněny acetylcholinem. Tato látka zprostředkovává vasorelaxaci a hyperpolarizaci endotelu zvyšováním produkce H_2O_2 . Vasorelaxace i hyperpolarizace je výrazně snížena u CuZnSOD^{-/-} myši kvůli nízké koncentraci H_2O_2 . Tento experiment naznačuje, že chemická podstata EDHF může být H_2O_2 . CuZnSOD produkuje H_2O_2 a je tak významným zprostředkovatelem vasorelaxace [25].

CuZnSOD souvisí také s nervovou regulací srdce. *Glomulus caroticum* je tělísko, které se nachází blízko bifurkace (rozdělení) aorty. *Glomulus caroticum* je velmi citlivé na změny v krevním řečišti (O_2 , CO_2 , pH, teplota krve) a zastává funkci baroreceptoru. Informace z *glomulus caroticum* jsou vedeny vlákny sympatiku do mozku. Do buněk *glomulus caroticum* myši, které trpěly chronickým srdečním selháním (CHF), byly vloženy adenoviry s DNA kódující CuZnSOD, které zvýšily její produkci. Naopak myši trpící CHF, do kterých adenovirus přenesen nebyl, měly expresi CuZnSOD velmi nízkou a měly tedy zvýšené množství O_2^- . U těchto myši bez adenovirů byly více aktivní chemoreceptory *glomulus caroticum* díky vysoké koncentraci O_2^- , který nadměrně dráždil nervová vlákna sympatiku, což během CHF vyústovalo ve zhoršení srdeční funkce. U myši, které byly infikovány adenovirem, došlo ke snížení aktivity chemoreceptorů *glomulus caroticum* během CHF, tato skutečnost by mohla vést ke zlepšení funkce srdce během CHF. Výsledky však zatím nejsou prokazatelné díky krátkodobé účinnosti adenovirů. Tento experiment nastínil možnost využití CuZnSOD v genové terapii srdce [26].

5.1.2 Extracelulární měď-zinková superoxididismutasa

Extracelulární měď-zinková superoxididismutasa (EC-SOD, SOD3) je přítomná na povrchu buněk v extracelulární matrix. Kladně nabitý C-konec se váže na heparansulfát a kolagen, čímž EC-SOD adhezuje k endoteliálním buňkám. EC-SOD je výrazně exprimována v endotelu cév, srdci, ledvinách a plicích. Přítomnost EC-SOD v mimobuněčném prostoru je

důležitá pro ochranu před tvorbou velmi reaktivního ONOO^- , který vzniká sloučením O_2^- s NO . EC-SOD významně ovlivňuje aktivitu NO v cévních stěnách a srdci a podílí se na regulaci krevního tlaku [27].

5.1.2.1 Struktura a reakční mechanismus EC-SOD

EC-SOD je homotetramerní glykoprotein, jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 135 kDa. Každá z podjednotek obsahuje atom Cu a atom Zn. EC-SOD obsahuje signální sekvenci, která slouží pro sekreci enzymu do extracelulární matrix, kde je následně odštěpena. Sekvence EC-SOD je částečně homologní se sekvencí intracelulární CuZnSOD, nejvíce v okolí atomů Cu a Zn [28].

Každá podjednotka se skládá z osmi antiparalelních β -listů, které se skládají v β -barel, a sedmi smyček. Nejdůležitějšími smyčkami jsou zinek-vázající smyčka a elektrostatická smyčka, která má afinitu k O_2^- , a tím ho orientuje do aktivního místa enzymu.

Atom Cu s oxidačním číslem II je umístěn mezi His96, 98, 113, 163 a atom Zn mezi His113, 121, 124 a Asp 127. Reakční mechanismus EC-SOD je obdobný CuZnSOD, bylo prokázáno, že v průběhu katalyzované reakce dochází k přerušení imidazolového spojení His113 mezi atomem Cu a atomem Zn [29].

5.1.2.2 Vliv EC-SOD na kardiovaskulární systém

EC-SOD je lokalizována na povrchu buněk myokardu a endotelu koronárních cév. Byl zkoumán vliv podání doxorubicinu na EC-SOD^{-/-} myši. Doxorubicin je chemoterapeutikum, které reakcí s O_2 produkuje ROS. Oxidační stres způsobený doxorubicinem vede ke zvýšenému výskytu kardiomyopatií a srdečního selhání. EC-SOD^{-/-} myši mají ztenčenou stěnu levé komory a naopak silnější stěnu mezi komorami. Levá komora EC-SOD^{-/-} myši je více postižena fibrosou a po podání doxorubicinu vykazuje zvýšenou aktivitu kaspasy 3, která aktivuje signální kaskádu vedoucí k apoptose. Nedostatek EC-SOD má tedy vliv na morfolonii srdce a schopnost buněk myokardu vstupovat do procesu apoptosy [30].

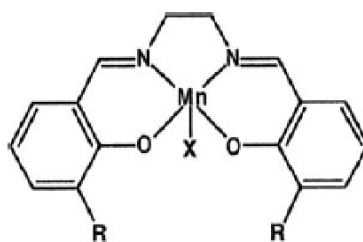
Jak již bylo uvedeno výše, EC-SOD je důležitým regulátorem krevního tlaku. U EC-SOD^{-/-} myši se v extracelulárním prostoru nacházelo větší množství O_2^- , který inaktivoval NO , což způsobilo sníženou schopnost relaxace aorty [31].

5.1.3 Manganová superoxiddismutasa

Manganová superoxiddismutasa (MnSOD, SOD2) je přítomná v mitochondriální matrix a je nejvíce vystavena ROS, které pocházejí z elektrontransportního řetězce. Po translaci vzniká enzym se signální sekvencí určující jeho transport do mitochondrií, ve kterých je aktivován odštěpením této signální sekvence [19].

MnSOD se v mnoha ohledech odlišuje od CuZnSOD a EC-SOD, a přibližuje se bakteriálním SOD. Optické vlastnosti MnSOD a bakteriálních SOD jsou podobné, stejně jako molekulová hmotnost (přibližně 88 kDa) či primární struktura podjednotek. Tyto okolnosti potvrzují správnost endosymbiotické teorie. Odlišnosti ve struktuře monomerů MnSOD a EC-SOD jsou prezentovány na obr. 6 [32].

MnSOD je esenciální pro aerobní organismy. Nedostatek MnSOD u MnSOD^{-/-} myši je letální již několik dní po jejich narození. Srdeční mitochondrie MnSOD^{-/-} myši jsou zatíženy obrovským množstvím O₂⁻. V důsledku nadměrné produkce ROS se u těchto myši vyskytují defektní mitochondrie, které zvyšují pravděpodobnost výskytu kardiomyopatií, nádorových onemocnění a neurodegenerativních chorob. Stav MnSOD^{-/-} myši se zlepšuje po podání syntetického antioxidantu EUK 189, který je mimetikem SOD a katalasy. Chemická struktura EUK 189 je Mn-5,10,15,20-tetrakis (4-benzoová kyselina) porfyrin, jak je znázorněno na obr. 5 [33, 34].

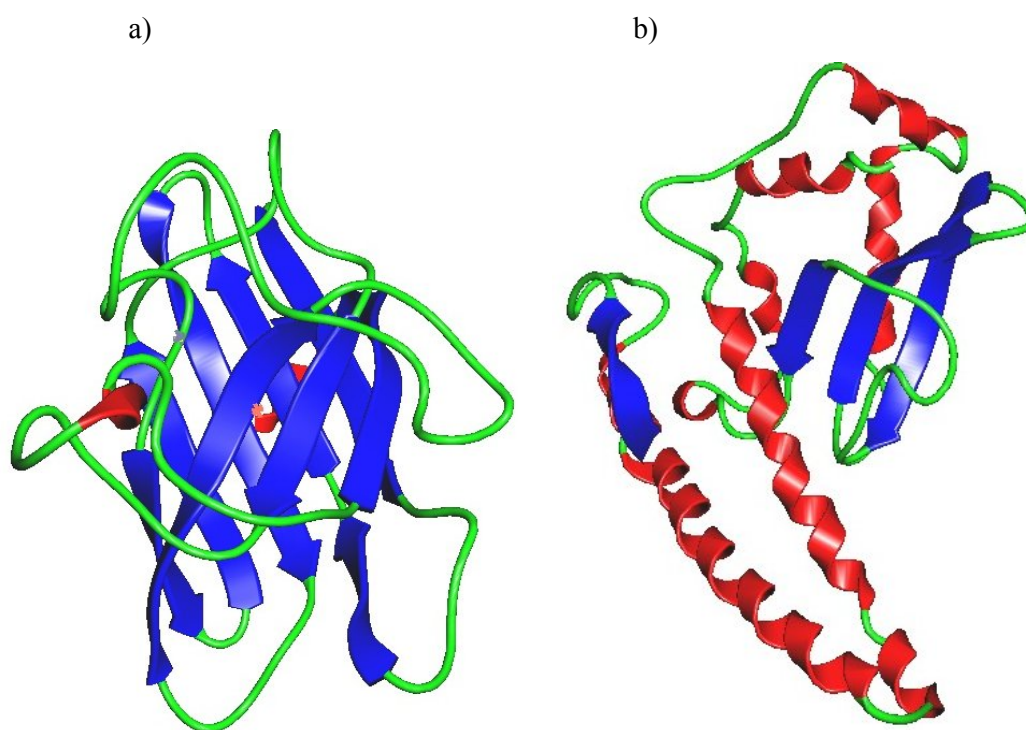


EUK-189: R = OCH₂CH₃

Obr. 5: Chemická struktura EUK 189. Převzato z [34].

5.1.3.1 Struktura MnSOD

MnSOD je homotetramer, každá z podjednotek obsahuje atom Mn. Ve struktuře monomeru jsou výrazné α -helixy, jak je patrné z obr. 6. Podjednotky se skládají v dimery, které pak spolu interagují prostřednictvím sedmi aminokyselinových zbytků (Leu60, Leu64, Tyr45, Gln61, Ile58, Leu49, Gln57) a tím se uspořádají do homotetrameru. Mutace ve vysoce konzervovaných Leu60 a Ile58 vede k destabilizaci dimerů, která umožní vznik nesprávných disulfidických můstků a inaktivaci MnSOD [35].



Obr. 6: Srovnání struktur monomerů SOD: a) Monomer EC-SOD, b) Monomer MnSOD. U EC-SOD je dominantní strukturou β -barel, zatímco MnSOD má velmi výrazné α -helixy. Upraveno podle koordinát PDB 2JLP [29] a 2P4K [36] v programu ArgusLab [37]. Obrázek připravila Bc. Eliška Procházková.

5.1.3.2 Reakční mechanismus MnSOD

Atom Mn během katalyzované přeměny dvou molekul O_2^- na O_2 a H_2O_2 slouží jako přenašeč elektronů, podobně jako u CuZnSOD se mění jeho oxidační stupeň. V prvním kroku reakce je atom Mn s oxidačním číslem III redukován na atom Mn s oxidačním číslem II a poté je zpětně oxidován na původní stav.

Aktivní místo MnSOD má tvar trigonální bipyramidy. Obsahuje tři His (26, 74, 163), Asp 159 a jednu molekulu vody. Aktivní místo je tvořeno kruhem kladného náboje, aby se zvýšila afinita O_2^- k enzymu [38].

Pro aktivní místo enzymu je důležitý zejména Tyr34, který se nachází v blízkosti atomu Mn. Tyr34 je donorem protonu při katalyzované redukci O_2^- na H_2O_2 . Tento aminokyselinový zbytek může podléhat nitraci na 3-nitro-Tyr34 a to působením $ONOO^-$, což vede k inaktivaci MnSOD. Při oxidačním stresu je tento jev velmi častý, protože O_2^- má vyšší afinitu k NO než s MnSOD [39].

Gln143 se nachází v blízkosti atomu Mn a je propojen vodíkovým můstkem s Tyr34. Při cílené záměně Gln143 za Asn dochází ke změně prostorového uspořádání. Asn143 a Tyr34 spolu nemohou tvořit vodíkový můstek, následuje adice další molekuly H_2O , která stabilizuje Mn s oxidačním číslem II a katalytická aktivita Mn-SOD se sníží o dva až tři řády [38].

5.1.3.3 Vliv MnSOD na kardiovaskulární systém

ROS v první řadě atakují proteiny, které obsahují Fe-S centra. Mitochondriální akonitasa a NADPH-oxidoreduktasa jsou díky přítomnosti těchto center velmi citlivé na oxidační stres. Aktivita zmíněných enzymů byla v srdečních mitochondriích MnSOD-/+ myši výrazně nižší. Dále byla u těchto myši zkoumána schopnost podléhat apoptose. Buňky srdce rychleji podléhaly apoptose, která byla stimulována zvýšením propustnosti vnitřní mitochondriální membrány podáním *tert*-butylhydroperoxidu. Rovněž se u nich objevovala zvýšená fragmentace jaderné DNA, která je jedním z hlavních indikátorů probíhající apoptosy [40].

Jak již bylo zmíněno, produkce ROS má za následek peroxidaci membránových lipidů. U buněk myokardu MnSOD-/- myši byla patrná již tři dny po jejich narození značná peroxidace lipidů. Dalším projevem vysokého oxidačního stresu u nich je zvýšené množství

3-nitro-Tyr. V srdci MnSOD-/+ myši starých 10 dní byla pozorována akumulace lipidových kapiček a agregace mitochondrií [41].

Také byl zkoumán vliv kardiotoxického doxorubicinu na srdce transgenních myší, které exprimovaly zvýšené množství lidské MnSOD. Doxorubicin byl aplikován v různých dávkách po dobu 5-ti dnů. Stěny myokardu komor netransgenních myší byly poškozeny podáním doxorubicinu o různých koncentracích. Defekty myokardu se projevily poškozením mitochondrií a neuspořádanými mikrofilamenty. Na srdci transgenních myší nebyly pozorovány žádné patofyziologické změny po vystavení doxorubicinu, zvýšená exprese MnSOD chránila srdce před škodlivými účinky použitého xenobiotika [42].

5.2 Peroxiredoxiny

Peroxiredoxiny (Prx, EC 1.11.1.15) jsou antioxidační enzymy katalyzující rozklad H_2O_2 . Prx neobsahují žádné prostetické skupiny ani ionty kovů. Byly objeveny v roce 1985 při experimentech, ve kterých neznámý enzym velký 25kDa chránil kvasinkovou glutaminsynthetasu před její degradací způsobenou ROS [43].

5.2.1 Systém savčích Prx

Geny pro Prx byly nalezeny ve všech prokaryotních i eukaryotních organismech. Pro jejich správnou funkci je nezbytná přítomnost jednoho nebo dvou konzervovaných Cys. Podle přítomnosti Cys rozdělujeme Prx do tří podrodin. První z nich jsou typické Prx obsahující 2 Cys, jeden Cys se nachází na N-konci (Cys47) a druhý na C-konci (Cys170). Druhá podrodina, atypické Prx obsahující 2 Cys, má ve své sekvenci konzervovaný pouze N-koncový Cys, ale pro svoji katalytickou aktivitu potřebuje i druhý Cys přítomný v polypeptidovém řetězci. Poslední podrodinou jsou Prx, které obsahují pouze jeden nezbytný Cys a to na N-konci. Savci v rámci těchto tří podrodin exprimují šest skupin Prx (PrxI - VI). Přehled zástupců Prx je uveden v následující tabulce I [44].

Tabulka I: Systém savčích Prx. Upraveno podle [45].

Rodina	Podrodina	Skupina	Lokalizace	Někteří zástupci
2Cys-Prx	Typické	PrxI	cytosol	NKEF-A, PAG, MSP23, OSF3, HPB23
		PrxII	cytosol	NKEF-B, kalpromotin, torin
	PrxIII	mitochondrie	MER5, SP-22	
	PrxIV	extracelulární prostor	AOE372, TRANK	
	Atypické	PrxV	mitochondrie, peroxisomy, cytosol	AOEB166, PMP20, ACR1
1Cys-Prx	1Cys-Prx	PrxVI	cytosol	ORF6, sekretorický protein p28, LTW4

5.2.2 Struktura Prx

V kvasinkovém Prx byly nahrazeny konzervované Cys47 a Cys170 Ser a exprimovány v *Escherichia coli*. Tyto mutanty obsahující Ser místo Cys se vyskytovaly pouze jako monomery, zatímco nezmutované Prx jako homodimery. Spojení do těchto dimerů bylo realizováno prostřednictvím disulfidického můstku mezi Cys47 a Cys170, které se nacházely na odlišných peptidových řetězcích. Mutanty, ve kterých byl Cys47 nahrazen Ser, byly inaktivní. Cys47 je tedy klíčový pro aktivitu enzymu [46].

5.2.3 Enzymatické funkce Prx

5.2.3.1 Rozklad H_2O_2

Pro srdce jsou nejvýznamnější Prx obsahující 2 Cys. U typických Prx obsahujících 2 Cys oxiduje molekula H_2O_2 Cys47 na Cys-SOH. Ta následně reaguje s Cys170 za vzniku intermolekulárního disulfidického můstku a současného odštěpení molekuly H_2O . Disulfidický můstek je zpětně redukován rodinou enzymů, které se nazývají thioredoxiny (Trx). Trx jsou zpětně redukovány thioredoxinreduktasami za přítomnosti NADH.

V případě atypických Prx obsahujících 2 Cys vzniká intramolekulární disulfidický můstek mezi Cys na stejném peptidickém řetězci, který je redukován glutathionem. Díky vzniku intramolekulárního disulfidického můstku jsou PrxV monomery [44, 45].

Při vysoké koncentraci H_2O_2 se může vyskytovat hyperoxidace aktivního místa Prx, ke které dochází reakcí H_2O_2 s Cys-SOH za vzniku Cys-SOOH. Prx s Cys-SOOH nemohou být substrátem pro Trx. Zpětnou redukci hyperoxidovaných Prx s Cys-SOOH uskutečňují sulfiredoxiny za spotřeby ATP. Sulfiredoxiny redukují PrxI - IV [47, 48].

5.2.3.2 Peroxynitritreduktasová aktivita

Lidské PrxV jsou schopné rozkládat kromě H_2O_2 i ONOO^- . Štěpí se vazba $-\text{O}-\text{O}-$ v ONOO^- , která je stejně jako H_2O_2 schopná oxidovat aktivní místo PrxV za vzniku intramolekulárního disulfidického můstku. Produktem reakce je NO_2^- . V aminokyselinové sekvenci lidského PrxV se nacházejí celkem tři Cys pro peroxynitritreduktasovou aktivitu, stejně jako pro rozklad H_2O_2 je esenciální Cys47 [49].

5.2.4 Vliv Prx na kardiovaskulární systém

Nejvýznamnějšími Prx z hlediska biologie srdce jsou PrxIII a PrxV, které srdce chrání před účinky H_2O_2 a ONOO^- .

Protein SP-22 patří mezi savčí mitochondriální PrxIII, dlouho se však o jeho antioxidační funkci diskutovalo. Při vystavení endoteliálních buněk hovězí aorty Fe^{II} , DTT, H_2O_2 , *tert*-butylhydroperoxidu a inhibitorům dýchacího řetězce došlo k zvýšené expresi SP-22. Tato skutečnost napovídá, že SP-22 je antioxidační enzym, který chrání mitochondrie před účinky ROS [50].

PrxIII v myších srdcích podléhá redoxním změnám během ischemie a následné reperfusion. Ischemie trvající 5min měla za následek zvýšenou dimerizaci PrxIII v důsledku vytvoření disulfidických můstků vlivem H_2O_2 . Dimerizaci PrxIII lze považovat za marker oxidačního stresu mitochondrií srdce [51]. Mitochondriální srdeční PrxIII asociují při zvýšeném oxidačním stresu s vnitřní mitochondriální membránou a tím je mitochondrie chráněna před jejím poškozením [47].

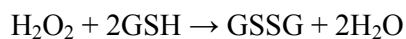
5.3 Glutathionperoxidasy

Glutathionperoxidasy (GPx, EC 1.11.1.9 a EC 1.11.1.12) jsou enzymy, které katalyzují redukci H_2O_2 a lipidických hydroperoxidů (ROOH) na H_2O a příslušné alkoholy. V savčích buňkách zatím bylo identifikováno 7 isoenzymů GPx (GPx1 - 7). Pro srdce jsou nejdůležitější GPx1 a GPx4. Pro většinu GPx je charakteristická přítomnost Se-Cys v aktivním místě enzymu. U všech GPx se ve struktuře vyskytuje typický Trx motiv, ve kterém jsou centrální β -listy obklopeny α -helixy, jeden α -helix spojuje β -list k sousedícímu β -listu a vytváří se tak $\beta\alpha\beta$ -struktura [52].

5.3.1 Reakční mechanismus GPx obsahujících Se-Cys

GPx obsahující Se-Cys mají v aktivním místě konzervovanou katalytickou triádu: Trp, Gln a Se-Cys. Se-Cys redukuje H_2O_2 dvěma elektrony na H_2O a sám se přitom oxiduje na selenol (Cys-Se-OH). Selenol je poté redukován zpět na Se-Cys pomocí glutathionu. V případě, že redukováná molekula není H_2O_2 ale ROOH, je reakční mechanismus stejný. ROOH však není redukován na H_2O , ale na příslušný alkohol [2].

Rovnice redukce H_2O_2 a ROOH katalyzované GPx:



5.3.2 Fosfolipidová hydroperoxidglutathionperoxidasa

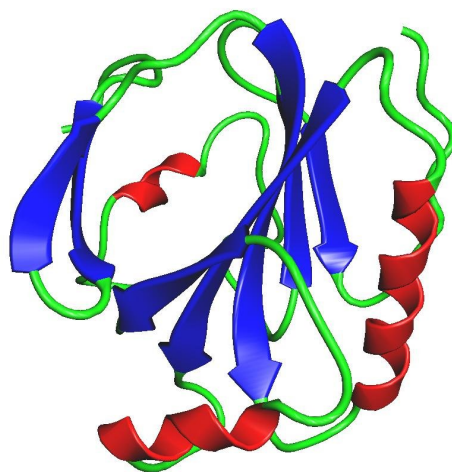
Fosfolipidová hydroperoxidglutathionperoxidasa (PHGPx, GPx4) se vyskytuje ve formě monomeru s molekulovou hmotností okolo 22 kDa. Výjimečnost PHGPx spočívá ve schopnosti katalyzovat redukci hydroperoxidovaných fosfolipidů, které se nacházejí v biologických membránách. Ostatní GPx ke své reakci potřebují volné lipidické hydroperoxydy, které jsou již odštěpené z fosfolipidů fosfolipasami. Pro studium enzymatické

funkce PHGPx byly použity membrány lidských erytrocytů, které byly poškozeny fotoperoxidací a následně vystaveny působení PHGPx. Přítomnost PHGPx způsobila rapidní pokles koncentrace hydroperoxidovaných fosfolipidů. Dále bylo prokázáno, že PHGPx je schopná redukovat i hydroperoxidovaný cholesterol [53].

Expresí PHGPx je nejsilnější ve varlatech, ledvinách, játrech a srdci. Existují tři isoformy PHGPx (cytosolická, mitochondriální a jaderná). Vysoký stupeň homologie mezi aminokyselinovou sekvencí PHGPx u člověka, potkana, prasete a myši, ukazuje na významnou funkci PHGPx v antioxidační ochraně fosfolipidových membrán [54].

5.3.2.1 Struktura PHGPx

Monomer PHGPx se skládá ze čtyř α -helixů, které se nacházejí na povrchu proteinu a sedmi β -listů, přičemž pět z nich tvoří centrální motiv, jak je zobrazeno na obr. 7. Katalytická triáda, která se skládá z Se-Cys46, Gln81 a Trp136, je lokalizována na povrchu enzymu mezi kladně nabitými aminokyselinami. Se-Cys46 je esenciální pro katalytickou aktivitu enzymu. Monomer PHGPx nemá na svém povrchu smyčku, která se vyskytuje u ostatních typů GPx. Nepřítomnost této smyčky je klíčová pro správné navázání fosfolipidů do aktivního místa enzymu [55].



Obr. 7: Struktura lidské PHGPx. Upraveno podle koordinát PDB 2OBI [55] v programu ArgusLab [37]. Obrázek připravila Bc. Eliška Procházková.

5.3.2.2 Mitochondriální PHGPx a její vliv na srdce

Mitochondriální PHGPx (mPHGPx) se nachází hlavně v intermembránovém prostoru mitochondrií a chrání je tak před účinky ROS, které pocházejí z elektrontransportního řetězce. Srdce myši exprimující pouze potkaní mPHGPx byla vystavena stimulaci ischemicko-reperfusního poškození srdeční tkáně. Nadměrná exprese mPHGPx u transgenních myši pozitivně ovlivňovala kontraktilitu myokardu během systoly především během reperfuse, při které se tvoří nadměrné množství ROS. Dále byla zaznamenána snížená membránová lipidová peroxidace. Srdeční membrány buněk myši, které nadměrně exprimovaly mPHGPx, byly chráněny před ischemicko-reperfusním poškozením [56].

5.3.3 Glutathionperoxidasa 1

Glutathionperoxidasa 1 (GPx1) je cytosolický homotetramerní protein velký přibližně 84 kDa. Substrátem pro GPx1 jsou kromě H_2O_2 i volné hydroperoxydy pocházející z fosfolipidů. Monomer GPx1 je tvořen čtyřmi α -helixy a čtyřmi β -listy. V jeho struktuře se vyskytuje pro GPx typický Trx motiv. Aktivní místo s katalytickou triádou je umístěno v jamce na povrchu enzymu [57].

5.3.3.1 Vliv GPx1 na kardiovaskulární systém

U GPx1-/+ myši dochází k dysfunkci endotelu cév související s nedostatkem NO , který se projevuje zejména paradoxní vasokonstriční odpovědí při podání vasodilatátorů např. bradykininu. U těchto myši se objevuje zvýšená peroxidace lipidů, histologické změny v srdeční tkáni, jako např. zvýšená fibrosa myokardu, a zvýšené množství kolagenu v koronárních arteriích [58].

Aktivitu GPx1 snižuje kouření, které přispívá k rozvoji kardiovaskulárních chorob, zejména infarktu myokardu [59].

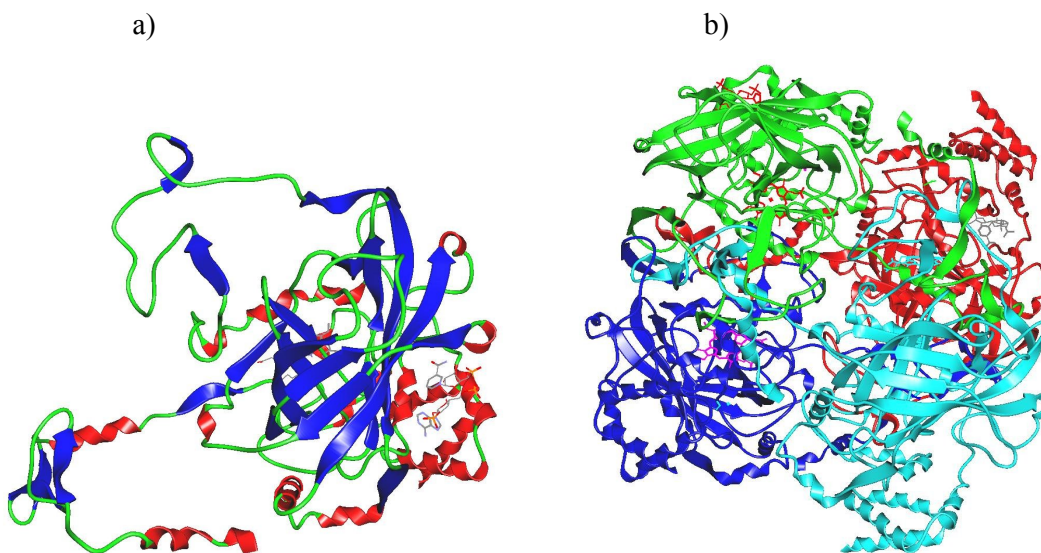
5.4 Katalasa

V roce 1901 Loew identifikoval enzym, který katalyzuje rozklad H_2O_2 a nazval jej katalasou (CAT, EC 1.11.1.6). CAT se nachází v cytoplasmě, peroxisomech a mitochondriích srdce potkana [63].

Katalytická funkce byla prokázána následujícím experimentem. Do HepG2 buněk byly vloženy plasmidy zvyšující expresi CAT v cytosolu a v mitochondriích. Buňky bez plasmidů měly vyšší intracelulární koncentrace H_2O_2 . Byla zkoumána cytotoxicita vysokých koncentrací H_2O_2 v kombinaci s menadionem a BSO, které negativně působí na buňku. Menadion je prekursor vitamínu K a chemoterapeutikum, jeho vysoké koncentrace jsou pro buňku toxické. BSO (buthioninsulfoximin) je inhibitor syntézy glutathionu. Buňky, které neobsahovaly plasmidy, snadno podléhaly apoptose. Tyto výsledky ukazují, že nadměrná exprese CAT chrání buňky i před zvýšeným oxidačním stresem [61].

5.4.1 Struktura monomeru CAT

CAT je homotetramerní hemoprotein. Molekulová hmotnost monomeru se pohybuje kolem 60 kDa. Hlavní část monomeru tvoří β -barel, na jeho povrchu se nachází osm α -helixů. Dále je na povrchu enzymu vazebné místo pro NADPH. Dva monomery se dohromady spojují pomocí tzv. závitového ramene a balící smyčky. Sbalení CAT do homotetrameru je nezbytné pro ochranu aktivních míst a správnou funkci enzymu. Struktura monomeru i tetrameru CAT je zobrazena na obr. 8 [62].



Obr. 8: Struktura lidské katalasy: a) Monomer, b) Homotetramer. Upraveno podle koordinát PDB 1DGF [62] v programu ArgusLab [37]. Obrázek připravila Bc. Eliška Procházková.

5.4.2 Reakční mechanismus CAT

V aktivním místě enzymu má Fe v nativní formě oxidační číslo III. V hemu je koordinováno k heteroatomům N a kovalentně vázáno k Tyr358. Povrch proteinu je s aktivním místem spojen prostřednictvím dutiny naplněné H₂O. Pro správnou katalytickou funkci CAT je klíčový zejména vysoce konzervovaný systém čtyř aminokyselinových zbytků (Tyr358, Arg354, His218 a Asn348), které se nachází v blízkosti hemu. Toto uspořádání je popsáno jako systém přenosu náboje a stabilizuje elektrostatické náboje vytvářené odlišnými oxidačními stavy Fe během katalytického cyklu [62].

První molekula H₂O₂ se naváže na Fe s oxidačním číslem III, které je tím oxidováno na Fe s oxidačním číslem IV. CAT katalyzuje heterolytické štěpení peroxidové vazby –O–O– za vzniku molekuly H₂O. Druhá molekula H₂O₂ se naváže do aktivního centra enzymu a dojde k transportu elektronů přes atom Fe až k systému přenosu náboje, tím se transformuje druhá molekula H₂O₂ na H₂O a O₂ [62].

Rovnice reakce katalyzovaná CAT: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

5.4.3 Vliv CAT na kardiovaskulární systém

V mitochondriích byla CAT identifikována jen v srdci potkana. Mitochondrie ze srdce potkana byly uloženy v anaerobním prostředí, po přidavku H_2O_2 došlo k produkci O_2 . Po expozici 3-amino-1,2,4-triazolu, specifického inhibitoru CAT, klesla produkce O_2 na 5% původní hodnoty. Tato fakta naznačují přítomnost CAT v mitochondriích srdce potkana [63].

CAT má rovněž vliv na peroxidaci membránových lipidů. Izolované mitochondrie ze srdce potkana byly současně vystaveny účinkům *tert*-butylhydroperoxidu a 3-amino-1,2,4-triazolu, jejich působení iniciovalo peroxidaci membránových lipidů. Poškození membrán bylo rozsáhlejší díky specifické inhibici CAT [64].

Během života dochází ke strukturním a funkčním změnám srdce. S přibývajícím věkem se objevuje zvětšování levé komory myokardu, zhoršená kontraktilita, diastolická dysfunkce a zvýšená fibrosa komor. Tyto defekty byly pozorovány v srdci starých myší. Pokud byla u myší zvýšena exprese mitochondriální CAT, transformace probíhaly pomaleji. Přítomnost CAT zpomaluje stárnutí srdce a působí kardioprotektivně proti patofyziologickým dějům [65].

6 Choroby srdce a cév spojené se zvýšeným oxidačním stresem

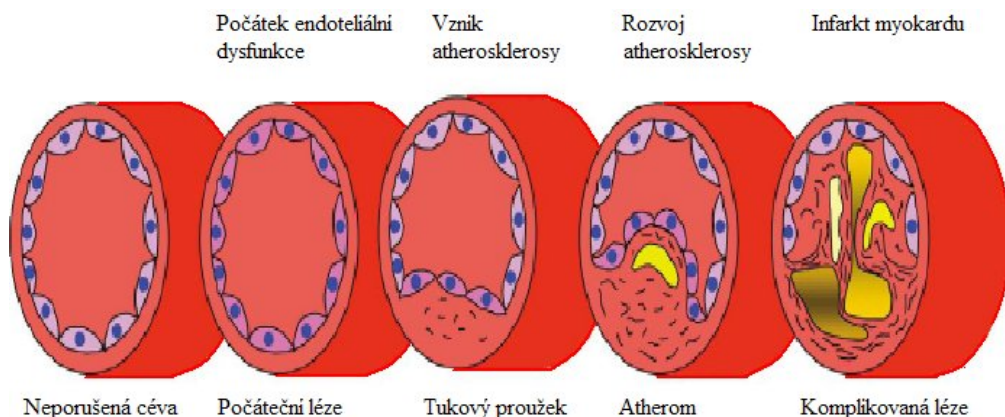
Kardiovaskulární onemocnění jsou částečně způsobeny inaktivací či nedostatkem antioxidačních enzymů, čímž může docházet ke zvýšenému oxidačnímu stresu. ROS a RNS jsou generovány endoteliálními buňkami, hladkými svalovými buňkami a monocyty. Vysoká koncentrace ROS a RNS hraje důležitou roli v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Stále však panují dohady, jestli zvýšená hladina ROS je primární příčinou, či oxidační stres jimi způsobený pouze zesiluje již existující patofyziologické změny v kardiovaskulárním systému [66, 67].

6.1 Atherosklerosa

Atherosklerosa je chronický zánět cévní stěny, který vzniká v závislosti na endotelové dysfunkci a vyúsťuje v patologické defekty cévní stěny.

Endotelová dysfunkce je předstupněm pro vznik atherosklerotických lézí. Endotelovou dysfunkcí nazýváme narušení homeostasy endotelu, která se projevuje vasokonstrikcí a trombogenezí. Příčinami endotelové dysfunkce jsou např. hypertenze, hypercholesterolemie, *diabetes mellitus*, obezita, kouření a podávání cytostatik. Všeobecně zastávaným názorem je, že endotelová dysfunkce je reversibilní děj. Původní fyziologickou homeostasu endotelu může obnovit např. snížení hladiny cholesterolu a redukce váhy pacienta [67].

Do poškozeného endotelu cévní stěny nejprve proniknou lipoproteiny, zejména LDL (lipoproteiny o nízké hustotě), které jsou poté modifikovány vlivem oxidačního stresu. Oxidované LDL aktivují endotel, který poté produkuje adhezivní molekuly a zánětlivé cytokiny pro průnik monocytů. Ty se v cévní stěně transformují na makrofágy fagocytující oxidované LDL. Vlivem pohlcování oxidovaných LDL makrofágy diferencují v pěnové buňky, které nejsou schopny cévní stěnu opustit, a později zde podléhají apoptose. Buněčná smrt má za následek vrácení oxidovaných LDL do lumen cévy a celý proces se neustále opakuje. Takto v cévě vzniká atherom, který má lipidové jádro složené z extracelulárně akumulovaných lipidů. Postupně dochází k proliferaci hladkých svalových buněk a zvýšené syntéze extracelulární matrix, která vytvoří vazivové pouzdro na lipidovém jádře atheromu. V konečném stádiu atherosklerotické léze dochází ke krvácení do atherosklerotického plátu, kalcifikaci odumřelých buněk a trombóze. Vývoj patologických změn v cévě od počáteční endotelové dysfunkce až ke komplikovaným atherosklerotickým lézím je znázorněn na obr. 9 [2].



Obr. 9: Postup patologických změn v cévní stěně od endotelové dysfunkce až ke komplikovaným aterosklerotickým lézím. Upraveno podle [67].

6.1.1 Role antioxidantních enzymů v aterosklerose

Rozvoj zánětu včetně aterosklerosy obecně potlačují Prx, které snižují koncentraci H_2O_2 , jež stimuluje expresi zánětlivých cytokinů. Endoteliálními buňkami jsou exprimovány zejména Prx1, které hrají důležitou roli v počátečním stádiu aterosklerosy. V endotelu Prx1^{-/-} myši byl zaznamenán několikanásobně větší výskyt leukocytů, které se po endotelu pohybovaly velmi nízkou rychlostí a snadno k němu adherovaly. Rychlost leukocytů byla nízká díky přítomnosti většího množství adhezivních molekul, které byly sekretovány endotelem. Nedostatek Prx1 tedy usnadňuje zachytávání leukocytů na povrchu endotelu a tím umožňuje vznik aterosklerotických lézí [68].

Současné výzkumy ukazují, že k zabránění vzniku aterosklerotických lézí je velmi důležitá EC-SOD. Jako model pro zjištění vlivu EC-SOD na aterosklerosu byly použity apolipoprotein E (ApoE) homozygotně deficientní myši. ApoE se vyskytuje na chilomikronech, které transportují triacylglyceroly do jater, kde se váží na receptory hepatocytů. Pokud je myš ApoE deficientní, transport triacylglycerolů do jater je stížený, což vede ke zvýšené hladině triacylglycerolů v krvi a přispívá k rozvoji aterosklerosy. Aktivita EC-SOD byla několikanásobně zvýšena u ApoE^{-/-} myši, zatímco aktivity CuZnSOD a MnSOD zůstaly nezměněny. Bylo zjištěno, že velká část této EC-SOD pochází z makrofágů naplněných lipidy, kteří exprimují kratší transkript EC-SOD. Nová forma EC-SOD byla přítomna i v pěnových buňkách. Tento experiment dokazuje, že makrofágy i pěnové buňky mají vlastní speciální formu protekce proti oxidačnímu stresu [69].

Dále byly vyšlechtěny homogyotně deficientní myši na ApoE a GPx1, GPx1^{-/-}ApoE^{-/-}. Těmto myším byla podávána strava bohatá na červené maso a živočišné tuky, která podporovala rozvoj atherosklerosy. Po této dietě se u nich zvýšil výskyt atherosklerotických lézí aorty, které obsahovaly více makrofágů, než kontrolní ApoE^{-/-} myši. Tato fakta ukazují, že deficiencie GPx1 vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu v aortě a rychlému rozvoji atherosklerosy [70].

6.2 Infarkt myokardu

Akutní infarkt myokardu je přerušování krevního toku v koronárních arteriích z důvodu destrukce vazivového pouzdra na povrchu atherosklerotického plátu a následného přilnutí trombocytů, které iniciují tvorbu krevní sraženiny (trombu). Trombus ucpe koronární arterii a myokard následně trpí ischemií. Srdce je schopné tolerovat pouze krátkodobou ischemii, při dlouhodobé dochází k nekroze kardiomyocytů [71]. Po infarktu myokardu srdce prodělává výrazné strukturní změny. Příčinami těchto strukturních změn jsou oxidační stres, zvýšená koncentrace zánětlivých cytokinů a odchylky ve složení extracelulární matrix. Kolagen v extracelulární matrix je degradován matrixovými metaloproteasami, což má za následek roztažení levé komory a zpětný tok krve, který zhoršuje srdeční funkci. Zároveň myokard neustále syntetizuje další velká množství kolagenu, který matrixové metaloproteasy nestíhají degradovat, což způsobuje fibrosu myokardu [72].

6.2.1 Role antioxidačních enzymů v akutním infarktu myokardu

Akutní infarkt myokardu má za následek pokles GPx1 a vitamínu E, které se významně podílejí na ochraně buněk před peroxidací membránových lipidů. Po infarktu myokardu srdce přichází o část antioxidační ochrany a je vystaveno případnému oxidačnímu poškození [73].

EC-SOD zabraňuje remodelaci levé komory a snižuje rozsah poškození srdce během infarktu myokardu. U EC-SOD^{-/-} myši byla po infarktu myokardu pozorována rozsáhlejší hypertrofie a dysfunkce levé komory, a zvýšená fibrosa tkáně [74]. Významná role EC-SOD před důsledky infarktu myokardu byla dále studována použitím genové terapie, při které byly králíkům injikovány adenoviry s lidskou cDNA kódující EC-SOD. Králičí srdce byla

vyjmuta, připojena na Langerdoffův přístroj a následně byl vyvolán infarkt. Oblast srdce poškozená infarktem byla u králíků, kteří podstoupili genovou terapii, výrazně menší než u kontrol [75].

6.3 Ischemicko-reperfusní poškození srdeční tkáně

Při ischemické chorobě se atherosklerotické pláty ukládají v koronárních arteriích srdce. Dochází k omezení průtoku krve ve stěnách myokardu, který trpí nedostatečným prokrvením tzv. ischemií. Při nezbytném obnovení průtoku krve tzv. reperfuse se produkuje velké množství ROS endoteliálními buňkami, kardiomyocyty a fagocyty. ROS jsou hlavní příčinou ischemicko-reperfusního (I/R) poškození srdeční tkáně [3].

6.3.1 Role antioxidačních enzymů v I/R poškození srdeční tkáně

Srdce je před I/R poškozením chráněno především pomocí MnSOD. Ischemický preconditioning (IPC) je opakovaná série krátkodobých uměle vyvolaných ischemií, které adaptují srdce na následnou ischemickou epizodu. IPC snižuje rozsah poškození srdce během I/R. U srdcí po 20min ischemii následované 30min reperfusí bez předchozího IPC, byl prokázán zvýšený cytosolický výskyt MnSOD doprovázený uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Migrace cytochromu c a MnSOD do cytosolu ukazuje na poškození integrity mitochondriálních membrán následkem I/R. Pokud jsou srdce adaptována na krátkodobou ischemii pomocí IPC, je transport MnSOD i cytochromu c do cytosolu během I/R menší. MnSOD, která během I/R zůstává v mitochondriích u zdroje ROS, lépe chrání buňku před oxidačním stresem [76]. Význam MnSOD během I/R poškození byl dále demonstrován na transgenních myších, které exprimovaly lidskou MnSOD. Aktivita MnSOD u těchto myší byla třikrát vyšší než u netransgenních myší. Srdce transgenních a kontrolních myší podstoupila 35min ischemii a následnou 45min reperfusi, ze které se transgenní myši zotavovaly lépe. Dále bylo zjištěno, že transgenní myši exprimující velké množství lidské MnSOD měly daleko menší rozsah poškození srdce po infarktu myokardu. MnSOD je tedy klíčovým enzymem chránícím srdce před I/R poškozením [77].

6.4 Kalcifikace a zúžení chlopní

Kalcifikace a zužování chlopní je velmi častým kardiovaskulárním onemocněním a chirurgická náhrada takto poškozených chlopní je dnes běžnou operací. Kalcifikované léze zapříčiňují neúplné otevření chlopně, v případě postižení aortální chlopně, dochází k omezení krevního toku v celém těle. Kalcifikované léze se podobají atherosklerotickým lézím, obsahují Ca, oxidované LDL a buňky podléhající apoptose. V kalcifikovaných oblastech se nachází velké množství O_2^- a H_2O_2 podobně jako v atherosklerotických lézích. Liší se původem O_2^- , v kalcifikovaných chlopních pochází O_2^- především z odprážených eNOS, zatímco v atherosklerotických lézích je produkován NADPH oxidasou. Dalším rozdílem je pokles aktivity všech typů SOD. Chlopně mají sníženou schopnost antioxidační ochrany před účinky O_2^- , zatímco u atherosklerotických lézí je EC-SOD zvýšená a aktivita CuZnSOD a MnSOD stejná jako za nepatologických podmínek. Aktivita CAT byla rovněž snížena v kalcifikovaných regionech. Vzhledem k tomu, že dochází k poklesu aktivity antioxidačních enzymů, buňky chlopní se tak nemohou dostatečně bránit proti oxidačnímu stresu [78].

7 Závěr

Tato práce shrnuje dosud známé informace o protektivním působení antioxidačních enzymů na kardiovaskulární systém, zejména na srdce. Popis mechanismů účinku objasnil jejich ochrannou funkci během oxidačního stresu. Všechny oblasti působení antioxidačních enzymů nejsou dosud známy, protože oxidační stres je velice komplexní proces, kterého se účastní mnoho buněčných kompartmentů a molekul. Bylo prokázáno, že kardioprotektivní účinky antioxidačních enzymů se projevují především během atherosklerosy, ischemicko-reperfusního poškození srdeční tkáně, infarktu myokardu a kalcifikace chlopní. Vzhledem k neustále se zvyšujícímu počtu pacientů, kteří trpí kardiovaskulárními chorobami, jsou antioxidační enzymy významným předmětem výzkumu z hlediska jejich potenciálního využití v prevenci a léčbě těchto onemocnění.

8 Použitá literatura

- [1] Scandalios J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014
- [2] Štípek S. a kol (2000) Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing s.r.o., 1. vydání, ISBN 80-7169-704-4
- [3] Misra M.K., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. (2009) Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Medical science monitor*, 15(10), 209-219
- [4] Karihtala P., Soini Y. (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 115(2), 81-103
- [5] Kehrer J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50
- [6] Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. (2001) Role of the reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transaction*, 29(2), 345-350
- [7] Turrens J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344
- [8] Darley-Usmar V., Halliwell B. (1996) Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceutical Research*, 13(5), 649-662
- [9] Murphy M.P., (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1-13
- [10] Hamanaka R.B., Chandel N.S. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 894-899
- [11] George J., Struthers A.D. (2009) Role of the urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular Health and Risk Management*, 5(1), 265-272
- [12] Murdoch C.E., Zhang M., Cave A.C., Shah A.M. (2006) NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovascular Research*, 71(2), 208-215
- [13] Guzik T.J., Sadowski J., Guzik B., Jopek A., Kapelak B., Przybylowski P., Wierzbicki K., Korbut R., Harrison D.G., Channon K.M. (2006) Coronary artery superoxide production

and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(2), 333-339

[14] Isin E.M., Guengerich F.P. (2008) Substrate binding to cytochrome P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1019-1030

[15] Gottlieb R.A. (2003) Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 420(2), 262-267

[16] Granville D.J., Tashakkor B., Takeuchi C., Gustafsson A.B., Huang C., Sayen M.R., Wentworth P. Jr, Yeager M., Gottlieb R.A. (2004) Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1321-1326

[17] Förstermann U., Münzel T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714

[18] McCord J.M., Edeas M.A. (2005) SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59(4), 139-142

[19] Faraci F.M., Didion S.P. (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1367-1373

[20] McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055

[21] Liou W., Chang L.Y., Geuze H.J., Strous G.J., Crapo J.D., Slot J.W. (1993) Distribution of the CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radical Biology & Medicine*, 14(2), 201-207

[22] Rakhit R., Chakrabartty A. (2006) Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(11-12), 1025-1037

[23] Beyer W.F. Jr, Fridovich I., Mullenbach G.T., Hallewell R. (1987) Examination of the role of arginine-143 in human copper and zinc superoxide dismutase by site-specific mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(23), 11182-11187

[24] Ogihara N.L., Parge H.E., Hart P.J., Weiss M.S., Goto J.J., Crane B.R., Tsang J., Slater K., Roe J.A., Valentine J.S., Eisenberg D., Tainer J.A. (1996) Unusual trigonal-planar copper configuration revealed in the atomic structure of yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry*, 35(7), 2316-2321

[25] Morikawa K., Shimokawa H., Matoba T., Kubota H., Akaike T., Talukder M.A., Hatanaka M., Fujiki T., Maeda H., Takahashi S., Takeshita A. (2003) Pivotal role of Cu,Zn-

superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(22), 1871-1879

[26] Ding Y., Li Y.L., Zimmerman M.C., Davisson R.L., Schultz H.D. (2009) Role of CuZn superoxide dismutase on carotic body function in heart failure rabbits. *Cardiovascular Reseach*, 81(4), 678-685

[27] Nozik-Grayck E., Suliman H.B., Piantadosi C.A. (2005) Extracellular superoxide dismutase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(12), 2466-2471

[28] Hjalmarsson K., Marklund S.L., Engström A., Edlund T. (1987) Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18), 6340-6344

[29] Antonyuk S.V., Strange R.W., Marklund S.L., Hasnain S.S. (2009) The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. *The Journal of Molecular Biology*, 388(2), 310-326

[30] Kliment CR., Suliman H.B., Tobolewski J.M., Reynolds C.M., Day B.J., Zhu X., McTiernan C.F., McGaffin K.R., Piantadosi C.A., Oury T.D. (2009) Extracellular superoxide dismutase regulates cardiac function and fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(5), 730-742

[31] Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P. (2003) Extracellular superoxide dismutase is major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circulation Reseach*, 93(7), 622-629

[32] Weisiger R.A., Fridovich I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (10), 3582-3592

[33] Motren K.J., Ackrell B.A., Melov S. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3354-3359

[34] Melov S., Doctrow S.R., Schneider J.A., Haberson J., Patel M., Coskun P.E., Huffman K., Wallace D.C., Malfroy B. (2001) Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *The Journal of Neuroscience*, 21(21), 8348-8353

[35] Hernandez-Saavedra D., Quijano C., Demicheli V., Souza J.M., Radi R., McCord J.M. (2010) Thiol-sensitive mutant forms of human SOD2, L60F, and I58T: the role of Cys140. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(9), 1202-1210

- [36] Perry J.J., Hearn A.S., Cabelli D.E., Nick H.S., Tainer J.A., Silverman D.N. (2009) Contribution of human manganese superoxide dismutase tyrosine 34 to structure and catalysis. *Biochemistry*, 48(15), 3417-3424
- [37] ArgusLab 4.0.1; Mark A. Thompson; Planaria Software LLC, Seattle, WA, <http://www.arguslab.com>, 9.7.2010
- [38] Hsieh Y., Guan Y., Tu C., Bratt P.J., Angerhofer A., Lepock J.R., Hickey M.J., Tainer J.A., Nick H.S., Silverman D.N. (1998) Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry*, 37(14), 4731-4739
- [39] Yamakura F., Taka H., Fujimura T., Murayama K. (1998) Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14085-14089
- [40] Van Remmen H., Williams M.D., Guo Z., Estlack L., Yang H., Carlson E.J., Epstein C.J., Huang T.T., Richardson A. (2001) Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(3), H1422-H1432
- [41] Strassburger M., Bloch W., Sulyok S., Schüller J., Keist A.F., Schmidt A., Wenk J., Peters T., Wlaschek M., Krieg T., Hafner M., Kumin A., Werner S., Müller W., Scharffetter-Kochanek K. (2005) Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(11), 1458-1470
- [42] Yen H.C., Oberley T.D., Vichitbandha S., Ho Y.S., St. Clair D.K. (1996) The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(5), 1253-1260
- [43] Kim K., Rhee S.G., Stadman E.R. (1985) Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(29), 15394-15397
- [44] Rhee S.G., Chae H.Z., Kim K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(12), 1543-1552
- [45] Shuvaeva T.M., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Lipkin V.M. (2009) Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(5), 523-537
- [46] Chae H.Z., Uhm T.B., Rhee S.G. (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7022-7026

- [47] Schröder E., Brennan J.P., Eaton P. (2008) Cardiac peroxiredoxins undergo complex modifications during cardiac oxidant stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(1), 425-433
- [48] Woo H.A., Jeong W., Chang T.S., Park K.J., Park S.J., Yang J.S., Rhee S.G. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3125-3128
- [49] Dubuisson M., Vander Stricht D., Clippe A., Etienne F., Nauser T., Kissner R., Koppenol W.H., Rees J.F. Knoop B. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Letters*, 571(1-3), 161-165
- [50] Araki M., Nanri H., Ejima K., Murasato Y., Fujiwara T., Nakashima Y., Ikeda M. (1999) Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2271-2278
- [51] Kumar V., Kitaef N., Hampton M.B., Cannell M.B., Winterbourn C.C. (2009) Reversible oxidation of mitochondrial peroxiredoxin 3 in mouse heart subjected to ischemia and reperfusion. *FEBS Letters*, 583(6), 997-1000
- [52] Lu J., Holmgren A. (2009) Selenoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 723-727
- [53] Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W. (1990) Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(1), 454-461
- [54] Knopp E.A., Arndt T.L., Eng K.L., Caldwell M., LeBoeuf R.C., Deeb S.S., O'Brien K.D. (1999) Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping. *Mammalian Genome*, 10(6), 601-605
- [55] Scheerer P., Borchert A., Krauss N., Wessner H., Gerth C., Höhne W., Kuhn H. (2007) Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*, 46(31), 9041-9049
- [56] Dabkowski E.R., Williamson C.L., Hollander J.M. (2008) Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(6), 855-865
- [57] Epp O., Ladenstein R., Wendel A. (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *European Journal of Biochemistry*, 133(1), 51-69
- [58] Forgione M.A., Cap A., Liao R., Moldovan N.I., Eberhardt R.T., Lim C.C., Jones J., Goldschmidt-Clermont P.J., Loscalzo J. (2002) Heterozygous cellular glutathione peroxidase

deficiency in mouse, Abnormalities in vascular and cardiac function and structure. *Circulation*, 106(9), 1154-1158

[59] Blankenberg S., Rupprecht H. J., Bickel C., Torzewski M., Hafner G., Tiret L., Smieja M., Cambien F., Meyer J., Lackner K.J. (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 349(17), 1605-1613

[60] Bai J., Cederbaum A.I. (2001) Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biological Signals and Receptors*, 10(3-4), 189-199

[61] Bai J., Rodriguez A.M., Melendez A.J., Cederbaum A.I. (1999) Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26217-26224

[62] Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y., Tainer J.A. (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 295-309

[63] Nohl H., Hegner D. (1978) Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat-heart mitochondria. *FEBS Letters*, 89(1), 126-130

[64] Radi R., Bush K.M., Freeman B.A. (1992) The role of the cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1), 409-415

[65] Dai D.F., Santana L.F., Vermulst M., Tomazela D.M., Emond M.J., MacCoss M.J., Gollahon K., Martin G.M., Loeb L.A., Ladiges W.C., Rabinovitch P.S., (2009) Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation*, 119(21), 2789-2797

[66] Heistad D.D., Wakisaka Y., Miller J., Chu Y., Pena-Silva R. (2009) Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular disease. *Circulation Journal*, 73(2), 201-207

[67] Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y. (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular disease. *Circulation Journal*, 73(3), 411-418

[68] Kisucka J., Chauhan A.K., Patten I.S., Yesilaltay A, Neumann C., Van Etten R.A., Krieger M., Wagner D.D. (2008) Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis. *Circulation Research*, 103(6), 598-605

[69] Fukui T., Galis Z.S., Meng X.P., Parthasarathy S., Harrison D.G. (1998) Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(10), 2101-2111

- [70] Torzewski M., Ochsenschirt V., Kleschyov A.L., Oelze M., Daiber A., Li H., Rossmann H., Tsimikas S., Reifenberg K., Cheng F., Lehr H.A., Blankenberg S., Förstermann U., Münzel T., Lackner K.J. (2007) Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(4), 850-857
- [71] Tsutsui M., Nakata S., Shimokawa H., Otsuji Y., Yanagihara N. (2008) Spontaneous myocardial infarction and nitric oxide synthase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(8), 275-279
- [72] Hori M., Nishida K. (2009) Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 81(3), 457-464
- [73] Cheng M.L., Cheng C.M., Ho H.Y., Li J.M., Chiu D.T. (2009) Effect of acute myocardial infarction erythrocytic glutathione peroxidase 1 activity and plasma vitamin E levels. *The American Journal of Cardiology*, 103(4), 471-475
- [74] van Deel E.D., Lu Z., Xu X., Zhu G., Hu X., Oury T.D., Bache R.J., Duncker D.J., Chen Y. (2008) Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(7), 1305-1313
- [75] Li Q., Bolli R., Qiu Y., Tang X.L., Guo Y., French B.A. (2001) Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation*, 103(14), 1893-1898
- [76] Jin Z.Q., Zhou H.Z., Cecchini G., Gray M.O., Karliner J.S. (2005) MnSOD in mouse heart: acute responses to ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288(6), 2986-2994
- [77] Chen Z., Sui B., Ho Y.S., Vincent R., Chua C.C., Hamdy R.C., Chua B.H. (1998) Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(11), 2281-2289
- [78] Miller J.D., Chu Y., Brooks R.M., Richenbacher W.E., Pena-Silva R., Heistad D.D. (2008) Dysregulation of antioxidant mechanisms in calcific aortic valvular stenosis in human. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(10), 843-850