

СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ КИСЕОНИКА

Кисић Божовић Б., Мирић Д., Драгојевић М., Драгојевић И.

Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

REACTIVE OXYGEN SPECIES

Кисић Божовић Б., Мирић Д., Драгојевић М., Драгојевић И.

Institute of biochemistry, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Reactive products of oxygen are among the most potent and omnipresent threats faced by the living organism. Intracellular accumulation of reactive oxygen species such as superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and peroxy radical, can arise from toxic insults or normal metabolic processes. These species may perturb the cell's natural antioxidant defence systems, resulting in damage to all of the major classes of biological macromolecules, including nuclear acids, proteins, carbohydrates and lipids. Oxidative stress has been defined as a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance, resulting in potential cell damage. It has been implicated in several biological and pathological processes like ageing, inflammation, carcinogenesis, ischemia-reperfusion and in diseases including diabetes mellitus, atherosclerosis, and/or neurodegenerative diseases.

Key words: Reactive oxygen species, Free radicals, Oxidative stress, Antioxidant.

САЖЕТАК

Реактивни кисеонички радикали представљају једну од најјачих и најчешћих претњи за живе организме. Слободни радикали кисеоника, као супероксид анјон радикал, водоник пероксид, хидроксил радикал, могу се скупијати у ћелији, због нормалних метаболичких процеса или различитих патолошких (токсичних) процеса. Ови реактивни радикали могу довести до поремећаја природног антиоксидационог одбрамбеног система, што резултира оштећењем биолошких макромолекула: нуклеинских киселина, протеина, угљених хидрата и липида. Оксидациони стрес се дефинише као поремећај равнотеже између прооксиданата и антиоксиданата, што доводи до потенцијалног оштећења ћелија. Сматра се да је оксидациони стрес један од узрочника бројних биолошких и патолошких процеса попут старења, упале, карциногенезе, исхемије-реперфузије, као и низа обољења: дијабетеса, атеросклерозе и/или неуродегенеративних болести.

Кључне речи: Слободни радикали кисеоника, Оксидациони стрес, Антиоксиданси.

УВОД

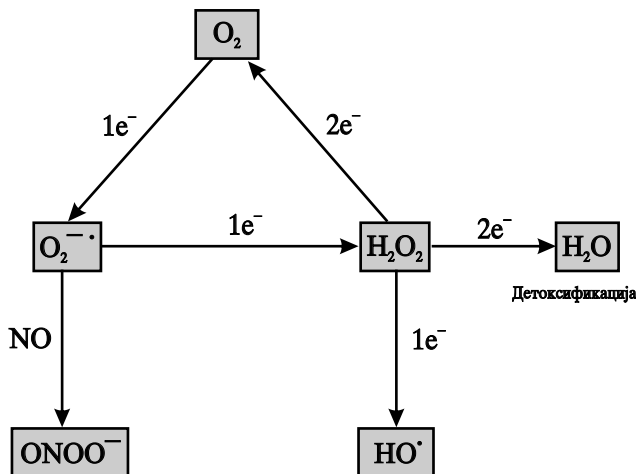
Слободни кисеонички радикали настају током бројних физиолошких и патолошких процеса, као споредни производи транспорта електрона у митохондријама. Нерадикали имају у својим орбиталама паран број електрона супротних спинова и ово стање је енергетски најповољније и најстабилније. За разлику од нерадикала, слободни радикали су атоми, јони или молекули са једним или више неспарених електрона у својој структури (1). Због присуства неспареног електрона слободни радикали имају магнетна својства и испољавају изразиту хемијску реактивност. Једном продукован слободни радикал може изазвати низ ланчаних реакција, реагујући са другим мање реактивним врстама. У организму су најзаступљенији слободни радикали кисеоника и азота. Конвенцијом је прихваћено да се неспарени електрон у слободним радикалима обележава тачком, тачка је на средини иза слободног радикала (R).

Стварање слободних радикала се дешава:

1. у току апсорпције радијације (зрачења),
2. у процесу оксидационе фосфорилације у митохондријама,
3. у процесу фагоцитозе,

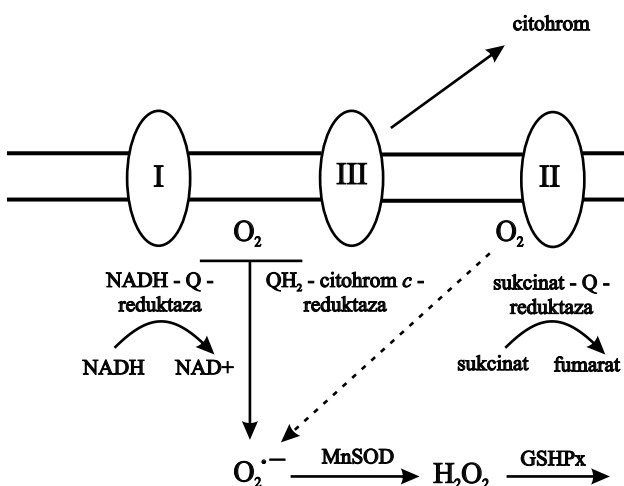
4. у процесу биотрансформације ендогених и егзогених супстрата у ендоплазматичном ретикулуму,
5. у процесу метаболизма етанола,
6. у ензимским реакцијама које катализују оксидацију,
7. у процесу синтезе еикосаноида (простагландини, тромбоксан, леукотријени),
8. у реакцијама оксидоредукције у присуству метала спроменљивом валенцом,
9. у процесу липидне пероксидације незасићених масних киселина (1).

Митохондрије су главно место стварања слободних радикала кисеоника у ћелији. Молекулски кисеоник се у организму сисара редукује до воде, примањем 4 електрона у респираторном ланцу митохондрија ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$) Овај процес је праћен ослобађањем енергије (АТФ) неопходне за функционисање ћелија. Међутим, током овог процеса, који се дешава у секвенци ткивног дисања, кисеоник се примањем једног електрона преводи у супероксид анјон радикал (O_2^-), примањем два електрона у водоник-пероксид (H_2O_2), три електрона у хидроксил радикал (ОН) и четири у воду (H_2O) (2) (сл. 1).



Слика 1. Насијање реактивних кисеоничких радикала.

Сматра се да су главни извори стварања реактивних кисеоничких врста у митохондријама УБИКИНОНСКА места у комплексима I (NADH-ubikion (Q)-reduktaza) и III (ubikinol (QH₂)-citohrom c-reduktaza), док је мањи допринос из комплекса II (sukcinat-ubikion (Q)-reduktaza) (3) (сл. 2). Висока концентрација ензима Mn-SOD у матриксу митохондрија обезбеђује да се физиолошка количина створеног O₂^{·-} неутрализује пре него што проузрокује оштећење ћелије. Око 1-5% O₂ утрошеног у митохондријама доводи до стварања O₂^{·-} тј H₂O₂ у нормалним условима (4).



Слика 2. Стварање супероксид анјон радикала у митохондријама.

Осим на овај начин, слободни радикали кисеоника могу настати у ћелији и активношћу ензима (NADPH-oksidaза, ксантин-оксидаза, citohrom P450, липо-оксигеназа, циклооксигеназа), аутооксидацијом малих молекула (катехоламини, флавилини), као и у редокс-циклусу ксенобиотика (адриамицин) (5). Организми/ћелије изложени су различитим утицајима из околине (зрачење, токсини) који такође изазивају појачано стварање слободних радикала кисеоника.

СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ КИСЕОНИКА

Најзаступљенији и најтоксичнији реактивни метаболити кисеоника су: супероксид анјон радикал (O₂^{·-}), хидрокси радикал (OH[·]), водоник пероксид (H₂O₂), липидни пероксиди, азот моноксид (NO), пероксинитритни анјон (ONOO⁻) и хипохлораста киселина (HOCl).

СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ (O₂^{·-})

Непотпуном, једноелектронском редуцијом молекулошког кисеоника настаје супероксид анјон радикал у својој јонизованој форми (O₂^{·-}), односно хидропероксидни радикал (HO₂[·]) у својој протонизованој форми: O₂ + e⁻ → O₂^{·-}

При физиолошким вредностима рН дешава се спонтана дизмутација два супероксид радикал у водоник пероксид, због чега је реактивност овог кисеоничног радикала ограничена. Иначе, он настаје у готово свим аеробним ћелијама, а митохондријални транспортни систем електрона је један од најзначајнијих процеса у коме се ствара O₂^{·-}. Важан извор O₂^{·-} је такође, "респираторна експлозија" (respiratory burst) у фагоцитним ћелијама (неутрофили, макрофаги) (6,7) при контакту са страним честицама или имуним комплексима. Бројна истраживања су показала да се више од 90% кисеоника утрошеног у процесу "респираторне експлозије" у фагоцитима трансформише у супероксид анјон радикал (1). Значајне количине O₂^{·-} продукују се у реакцијама оксидаза, као што су ксантин оксидаза, NAD(P)H оксидаза, цитохром P-450 оксидаза, алдехид оксидаза (8). По хемијским особинама супероксид анјон радикал представља слабу киселину, а због вредности редокс потенцијала система O₂/O₂^{·-}, супероксид анјон радикал је чешће редуцијом него оксидацијом средство. O₂^{·-} има способност да редукује хиноне и да оксидише витамин C, витамин E, катехоламини, хемопротеине. У воденој средини O₂^{·-} подлеже реакцији дизмутације, која представља реакцију два молекула супероксид анјон радикала, при чему се један оксидује, а други редукује (O₂^{·-} + O₂^{·-} + H⁺ → O₂ + H₂O₂) (9). Ова се реакција може одвијати спонтано или уз каталитичко дејство супероксид дизмутазе (SOD). Спонтано тече веома брзо у киселој средини (рН4,8), док се у неутралној или алкалној средини одвија споро, те се *in vivo* O₂^{·-} углавном уклања ензимски.

Супероксид анјон радикал се у присуству метала са променљивом валенцом преводи у хидрокси радикал (OH[·]), који има јака оксидациона својства (8,10).

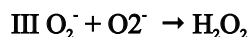
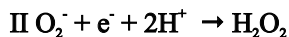
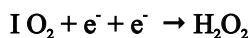
Синтетисан унутар ћелијске мембране, супероксид анјон радикал је веома токсичан, јер је нуклеофилни редукујући агенс и делује на карбонилне групе естарских веза између масних киселина и глицерола оштећујући фосфолипиде мембране.

Адицијом још једног електрона на супероксид анјон радикал настаје пероксидни анјон, који нема неспарених електрона и није радикал. Сва количина пероксидног анјона настала у физиолошким условима бива протонизована и настаје водоник пероксид.

ВОДНИК ПЕРОКСИД (H₂O₂)

H₂O₂ је најстабилнији интермедијер редуције кисеоника. H₂O₂, као и хипохлораста киселина, не посе-

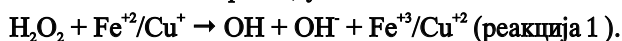
дује неспарени електрон, те у правом смислу те речи и није слободни радикал. Настаје директно двоелектронском редукцијом молекулског кисеоника (I), једноелектронском редукцијом супероксид анјон радикала (II) или његовом ензимском дизмутацијом, дејством SOD (III):



Стварање водоник пероксида се дешава на нивоу пероксизома, митохондрија, микрозома и ћелијске мембране. Највећа количина водоник пероксида се ствара у пероксизомима, у којима је присутна висока активност каталазе, која штити овај део ћелије од оксидативног оштећења. Токсичност водоник пероксида није последица директног дејства на биомолекуле, већ могућности да реагује са супероксид анјон радикалом (Haber-Weiss реакција) (8) у присуству метала са променљивом валенцом (гвожђе, бакар или манган) (Фентонова реакција) и да доведе до стварања високо реактивног хидроксил радикала (10). Ове реакције *in vivo* превенирају каталаза и пероксидаза, које разлажу водоник пероксид, али и супероксид дизмутаза која онемогућава Haber-Weissovu реакцију (11).

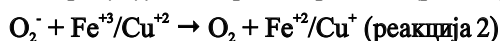
ХИДРОКСИЛРАДИКАЛ (ОН)

Хидроксил радикал настаје непотпуном редукцијом молекулског кисеоника, примањем три електрона. Он је хемијски најреактивнији кисеонички радикал и најодговорнији за цитотоксичне ефекте кисеоника. Хидроксил радикал се у ћелијама ствара увек када постоје услови за реакцију Haber-Weiss i Fenton, као и у процесу фагоцитозе (1,8). Да једноставна мешавина водоник пероксида и двовалентног гвожђа, продукује хидроксил радикал, запазио је још 1894. Фентон, а реакција је позната као Фентонова реакција:

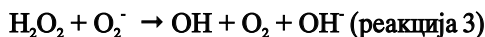


Каснија истраживања потврдила су образовање хидроксилних радикала и у биолошким системима.

У Фентоновој реакцији, у присуству метала са променљивом валенцом, O_2^- најпре реагује са оксидованом формом метала, који се редукује (уз ослобађање кисеоника) (реакција 2) и реагујући потом са водоник пероксидом продукује се хидроксил радикал (реакција 1).



Сума реакција 1 и 2, специфична за живе ћелије је позната као Haber-Weiss реакција (10) у којој водоник пероксид, иако није прави радикал, у реакцији са супероксид ањоном даје веома токсичан хидроксил радикал:



Ово говори да метали са променљивом валенцом (нарочито гвожђе и бакар) имају важну улогу у формирању хидроксил радикала (10,12) у организму.

За Фентонову и Haber-Weiss-ovu реакцију, највећи део гвожђа је недоступан, јер је везан са различитим протеинима (хемоглобин, миоглобин, металоензими) или је у транспортним протеинима (трансферин, лактоферин) или у складишним протеинима (феритин,

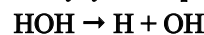
хемосидерин) из којих се ослобађа само под контролисаним условима. (13). У процесу прерасподеле гвожђа у ћелији, долзи до његовог издвајања из феритина (као облика резервног гвожђа), што је критични тренутак за његово укључивање у Фентон реакцију.

Хидроксил радикал је снажно оксидујуће средство, има изузетно кратак полуживот (10^{-9} s) и може одмах да реагује са сваком врстом молекула присутном у ћелији: угљеним хидратима, аминокиселинама, фосфолипидима, пуринским и пиримидинским базама и органичким киселинама, а при томе су могућа три типа реакција:

1. одузимање водоника
2. адиција може се адирати на молекуле ароматичне структуре (нпр. пуринске и пиримидинске базе ДНК)
3. трансфер електрона.

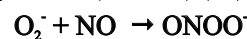
Хидроксил радикал може одузети водоников атом многим биомолекулима, па тако оксидишући полинезасићене масне киселине у биомембранама иницира процес липидне пероксидације, који се даље може пропагирати секундарно створеним слободним радикалима.

Велики број података о оштећењу живих система слободним радикалима добијен је експерименталним излагањем ћелија зрачењу са високом енергијом. Нпр. зрачење изазива разлагање једне ковалентне везе кисеоник-водоник у молекулу воде, при чему настају:

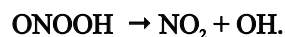


АЗОТМОНОКСИД (NO)

Азот моноксид се синтетиче у току стереоспецифичне оксидације једног од терминалних азота гванидино групе L-аргинина, каталитичком активношћу азот-моноксид синтазе (NOS, EC 1.14.13.39) (14). Откривене су три изоформе NOS: ендотелна, неуронална и макрофагна (15). Ендотелна и неуронална изоформа су нормални састојци ћелија, док се макрофагна изоформа индукује у ендотелним, глаткомишићним, имуним ћелијама и миоцитима, дејством цитокина или бактеријских ендотоксина. Ефекти азот монооксида укључују релаксацију глатких мишића васкулатуре, васкуларни пермеабилитет, инхибицију адхезије и агрегације тромбоцита, модулирање леукоцит-ендотелне интеракције, митогенезу и пролиферацију фибробласта и глаткомишићних ћелија крвних судова (1,16,17). NO је слободни радикал мале молекулске масе, липофилне природе и хемијски нестабилан, у биолошким системима лако реагује са сулфхидрилним групама биомолекула и јонима метала. Високе концентрације NO испољавају директне токсичне ефекте у ћелијама и врше инхибицију ензима у различитим деловима ћелије. Реакција између NO и супероксид анјон радикала у воденој средини дешава се огромном брзином, при чему се синтетиче пероксинитритни радикал (ONOO \cdot) (18):



Уколико веже протон, пероксинитрит добија својства која су слична својствима хидроксил радикала:



УЛОГА СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА У ФИЗИОЛОШКИМИ ПАТОФИЗИОЛОШКИМ МЕХАНИЗМИМА

У ћелијама сисара, слободни радикали кисеоника имају велику разорну моћ, али не треба заборавити да су они укључени и у физиолошке процесе у организму. Они су део одбрамбеног арсенала фагоцитних ћелија (полиморфнонуклеара, макрофага, моноцита) и део каскадних догађаја у антимицробној активности фагоцита. Фагоцитоване честице су у овим ћелијама изложене великој количини створеног O_2^- у процесу »респираторне експлозије«, која настаје након активације мембранске NAD(P)H оксидазе (6,7,19). Спонтану реакцију дизмутације супероксид анјона је брза у киселој средини, док се у неутралном рН активношћу супероксид дизмутазе фагоцита, супероксид анјон преводи у H_2O_2 . Водоник пероксид у фагоцитним ћелијама настаје и директном двоелектронском редукцијом молекулског кисеоника. Лизозомалне мјелопероксидазе фагоцита (неутрофила) користе H_2O_2 као супстрат и у присуству Cl^- стварају хипохлорасту киселину ($H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-$) (18,20). Хипохлораста киселина може да оксидује многе молекуле, нарочито аминне и аминокиселине, тиоле, ароматичне и друге незасићене угљоводнике. Осим тога, O_2^- у киселој средини фагоцитне вакуоле или у околини ћелијске мембране, може бити протонизован у перхидрокси радикал HO_2^- , који је веома реактиван и цитотоксичан.

Слободни радикали могу бити и регулаторни молекули у биохемијским процесима. Лимфоцити и фибробласти, нпр., стварају мале количине супероксид анјона, који је регулатор раста (21). Даље, слободни радикали учествују у инхибицији или индукцији различитих сигналних путева (деловање на протеинске киназе, фосфатазе, протеазе, факторе транскрипције), утичу на експресију појединих гена (22), индукцију или инхибицију пролиферације ћелија (4,23).

ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

Уколико се наруши осетљива равнотежа између стварања и уклањања слободних радикала, долази до њиховог накупљања у већој количини (због повећаног стварања и/или смањеног уклањања детоксикационим системима ћелије) и претварања у снажне разараче ћелије. До повећања концентрације реактивних кисеоничких радикала, најшешће долази због неефикасности механизма њиховог уклањања (стварање слободних радикала надмашује капацитет ћелије да их детоксикује). То узрокује нарушавање равнотеже између прооксиданаса и антиоксиданаса, у корист прооксиданаса и на тај начин настаје оксидациони стрес, који може на различите начине пореметити метаболизам и оштетити биолошки значајне макромолекуле (3,4), што резултира настанком и развојем бројних патолошких стања.

ОКСИДАЦИОНА МОДИФИКАЦИЈА БИОМОЛЕКУЛА

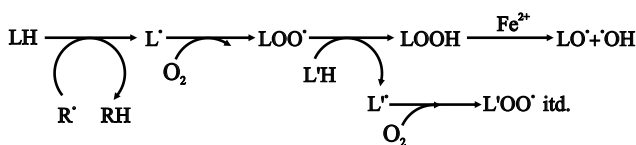
Оксидационо оштећење липида (Пероксидација липида)

Липидна пероксидација је оксидационо оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротеине и

друге молекуле који садрже липиде у условима постојања оксидационог стреса (1). Масне киселине у липидима ћелијских мембрана садрже различити број угљеникових атома (од 14 до 24), а арахидонска киселина са највећим бројем двоструких веза представља најосетљивији супстрат за процес липидне пероксидације. Процес пероксидације липида нађен је у преко сто болести, при чему у атерогенези, исхемично-реперфузионом оштећењима и канцерогенези овај процес представља један од непосредних узрока основне болести (24).

Пероксидација масних киселина је ланчана реакција, почиње атаком кисеоничког радикала, који има способност да из вишеструко незасићене масне киселине издвоји атом водоника, из метил групе ($-CH_2-$) која се налази у алфа-положају у односу на двогубу везу. Уклањајући водоников атом уклања се и електрон, те остаје неспарени електрон на C-атому, при чему се формира алкил радикал. У циљу даље стабилизације долази до интрамолекулског преуређивања двогубих веза у алкил радикалима и стварања коњугованих диена, који брзо реагује са молекулским кисеоником дајући перокси радикале (LOO^\cdot). Перокси радикали такође имају способност да издвоје атом водоника из друге масне киселине и тако наставе ланац реакција липидне пероксидације. На овај начин реакција липидне пероксидације улази у фазу пропагације и аутооксидације, која резултира формирањем липидних хидропероксида ($LOOH$) и нових алкил радикала (24). Дужина овог ланца пероксидације липида зависи од броја липидних перокси радикала, који имају водећу улогу у овом оксидационом ланцу.

Разградњом липидних хидропероксида у присуству јона прелазних метала (гвожђа) и металокомплекса (хемоглобин, миоглобин, цитохроми) стварају се нови радикали липида: алкокси радикал (LO) и перокси радикал ($L-OO$), који могу да издвоје атом водоника из интактне масне киселине и започну нову рунду липидне пероксидације (слика 3) (25,26).



Слика 3. - Шема процеса липидне пероксидације, ланчана реакција резултира формирањем великог броја липидних перокси радикала.

Разградњом примарних продуката пероксидације липида (коњуговани диени, перокси радикали и липидни хидропероксиди) настају секундарни продукти липидне пероксидације кратколанчани испарљиви угљоводоници, алдехиди и крајњи продукт пероксидације липида малондиалдехид (MDA). MDA се појављује у плазми и урину и најчешће је одређивани показатељ интензитета липидне пероксидације и оксидационог стреса. (25).

У процесу детоксикације примарних продуката липидне пероксидације, пре свега липидних хидропероксида, што доводи до терминације липидне пероксидације, учествују три ензима: класична глутатион перокси-

даза (GSH-Px), фосфолипид хидропероксид глутатион пероксидаза (PHGSH-Px) и селен-независна GSH-S-трансфераза тип (1,27).

Последице пероксидационог процеса на компонентама ћелијских мембрана су повећана пропустљивост фосфолипидног двослоја, промењен јонски транспорт, оксидација тиолних група ензима и последична инактивација ензима, стварање метаболита (нарочито MDA) који имају способност стварања интер/интрамолекуларних веза са функционалним групама биомолекула (протеина, ензима, фосфолипида), при чему се мењају њихова структурно-функционална својства (24,26,28).

Оксидационо оштрење протеина

У процесу оксидационе модификације протеина мења се њихова структура, што доводи до измене функционалне активности. Оксидациона модификација ензима и структурних протеина организма настаје као резултат интеракције конститутивних аминокиселина протеина са слободним радикалима (29) или долази до секундарне модификације протеина једињењима која настају у току реакција других биомолекула (нпр. липида тзв. липоксидација) са слободним радикалима (28). Наиме, деградациони производи липидне пероксидације могу реаговати са аминокиселинама бочних ланаца аминокиселина и мењати њихов набој и особине. Нпр. везивањем MDA, деградационог производа пероксидације липида, за остатке лизина у аров протеинима липопротеина мале густине (LDL), смањује се позитивни набој површине LDL, што има улогу у развоју атеросклерозе (30).

Оксидациона модификација протеина је доказана у стањима и обољењима, као што су: старење, коронарна и церебрална оклузија, плућни емфизем, катаракта, реуматоидни артритис, канцерогенеза и др. (1). На већем броју експеримената је утврђено да је гвожђе један од елемената који је најодговорнији за оксидациону модификацију протеина. Бројне студије су показале да се количина оксидационо модификованих протеина у организму повећава са годинама, што је последица слабења биолошких система елиминације оксидационо модификованих протеина (31). Биомаркери оксидације протеина су најчешће оксидациони производи фенолаланина и тирозина. Оксидацијом тирозина настаје ди-тирозин, који може бити маркер оксидационог стреса (32). У процесу оксидационе модификације протеина настају и карбонил радикали, који се обично зову карбонилне групе и одређивање њихове концентрације може бити показатељ оксидационе модификације протеина.

Оксидационо оштрење ДНК

Слободни радикали кисеоника, а нарочито хидроксил радикал, испољавају и мутагени ефекат кроз хемијску модификацију ДНК (9,11). Последица атака слободних радикала на ДНК су: одвајање и цепање ланаца ДНК, хидроксилација конститутивних база у молекулу ДНК, интеракција база унутар једне спирале ДНК, интеракција база између две различите ДНК спирале, оксидациона модификација дезоксирибозе, интеракција са липидним пероксидима (MDA), измена база, модификација базе и др (1). Посебно су значајне промене (реструктурирање) генетског материјала на секвенцама ДНК

где су кодирани регулаторни гени, односно протоонкогени, јер тиме долази до поремећаја у регулацији ћелијске пролиферације, што је сигнал за канцерогени фенотип. Бројна испитивања су показала да малондиалдеhid (продукт пероксидације липида) може изазвати мутацију ДНК и променити генску експресију (33). Мутагени и канцерогени ефекти MDA се најчешће везују за његову могућност интеракције са ДНК, захваљујући поларној структури и могућности проласка кроз мембрану једра. Али реактивне кисеоничке врсте су одговорне и за нормалан процес старења (2) и програмиране ћелијске смрти (апоптозе) (4) која је позитивни ефекат у односу на малигну алтерацију.

ЛИТЕРАТУРА

1. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala 2000; Medicinski fakultet, Niš.
2. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol & Med* 2000; 29(3/4): 220-230.
3. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002; 84: 131-141.
4. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002; 265:49-72.
5. Mather P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1287-1305.
6. Nauseef WM. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 373-382.
7. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef FW. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397(2): 342-344.
8. Liochev S, Fridovich I. Role of O₂⁻ in the production of OH in vitro and in vivo. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 29-33.
9. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol and Med* 2001; 31(11): 1287-1312.
10. Fridovich J. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases and related matters. *J Bio Chem* 1997; 272: 18515-517.
11. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro J. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
12. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272.
13. Harris LR, Cake MA, Macey DJ. Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates. *Biochem J* 1994; 301: 385-389.
14. Moncada S, Higgs A. L-Arginine - Nitric Oxide Pathway. *The New Engl J of Med* 1993; 329(27): 2002-2012.
15. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen Reduction by Nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14533-536.
16. Price DT, Vita JA, Keaney JF Jr. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2(4): 919-35.
17. Cooke JP. Flow, NO, and atherogenesis. *PNAS* 2003; 100(3): 768-770.
18. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact* 1995; 96: 203-206.
19. Rossi F, Bellavite P, Barton G, et al. Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Pathol Res Pract* 1985; 180: 136-142.

20. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1): 53-58.
21. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996; 243(21): 81-119.
22. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 67-101.
23. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 345-350.
24. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochem and Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-676.
25. Loeckie L de Zwart, Meerman J, Commandeur J, Vermeulen N. Biomarkers of free radical damage applications animals and in humans. *Free Rad Biol and Med* 1999; 26: 202-226.
26. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306: 1-17.
27. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radic Biol Med* 1999; 27: 951-965.
28. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-966.
29. Hawkins LC, Davies JM. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Bioch et Bioph Acta* 2001; 1504 :196-219.
30. Chen J, Mehta JL. Role of Oxidative Stress in Coronary Heart Disease. *IHJ* 2004; 5: 47-75.
31. Duikan S, Farewell A, Ballestores M, Taddei F, Radman M. Protein oxidation in responses to increased transcriptional or translation errors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5746-9.
32. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeilliere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-13.
33. Marnet LJ. Lipid peroxidation-DNA-damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83-95.