

## ЗАШТИТА ОРГАНИЗМА ОД ШТЕТНОГ ДЕЈСТВА СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА КИСЕОНИКА

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

Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

## PROTECTION OF ORGANISM AGAINST REACTIVE OXYGEN SPECIES

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

Institute of biochemistry, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

### SUMMARY

Cells continuously produce free radicals and reactive oxygen species as part of metabolic processes. These free radicals are neutralized by antioxidant defense system consisting of enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and numerous non-enzymatic antioxidants, including vitamins A, E and C, glutathione, ubiquinone, and flavonoids. Antioxidants include both water and lipid soluble varieties. The lipid soluble antioxidants are located in the cellular membranes and lipoproteins, whereas the water soluble antioxidants are present in the aqueous environments, such as fluids inside cells and in the blood.

**Key words:** Reactive oxygen species, Antioxidant, Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, Catalase, Vitamins A, E and C, Glutathione.

### САЖЕТАК

Аеробни организми, непрекидно изложени утицају кисеоника, развили су током еволуције системе одбране од оксидационог напада. Системи антиоксидационе заштите ћелија и екстрацелуларног простора у физиолошким условима одржавају реактивне кисеоничке врсте у ниским концентрацијама. Прву линију ове заштите чине ензими детоксикације супероксид анјон радикала и водоник пероксида (супероксид димутаза, глутатион пероксидаза и каталаза), а неензимски антиоксиданси: аскорбинска киселина, токоферол, каротен, непротеински тиоли (првенствено редукован глутатион), као и протеинске SH групе, чине другу линију одбране. Антиоксидациона заштита организма зависи од динамичке равнотеже свих чинилаца.

**Кључне речи:** Слободни радикали кисеоника, Антиоксиданси, Супероксид димутаза, Глутатион пероксидаза, Каталаза, витамин А, Е и Ц, Глутатион.

### УВОД

Аеробни организми, непрекидно изложени утицају кисеоника, развили су током еволуције системе одбране од оксидационог напада, који обухватају превенцију, лимитирање и репарацију оксидационог оштећења. Осетљивост неког ткива на дејство слободних радикала зависи од његових потреба за енергијом и заступљености полинезасићених масних киселина, а ефикасност заштите зависи од активности и присуства елементарних који чине ендегену антиоксидациону заштиту. Најважнији чиниоци антиоксидационе заштите организма су: ензими (супероксид димутаза, глутатион пероксидаза, глутатион трансфераза, каталаза) и неензимски антиоксиданси: витамини (токоферол, аскорбинска киселина, каротен), тиолова једињења (глутатион), албумин, билирубин, мокраћна киселина, полиамини и други (табела 1).

Прву линију антиоксидационе заштите организма чине ензими, који катализују реакције детоксикације слободних радикала ( $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$ ) и тако спречавају њихов утицај на осетљиве ћелијске структуре. Неензимски

антиоксиданси чине секундарну линију одбране и лимитирају оксидационе процесе. Према афинитету и растворљивости у липидима неензимски антиоксиданси се могу поделити на липо- и хидросолубилне, од чега зависи и место њиховог деловања. Липосолубилни антиоксиданси делују у липидној фази ћелијске мембране и мембранама ћелијских органела, као и у серумским липопротеинима. Хидросолубилни антиоксиданси делују у воденом медијуму (1).

С обзиром, да у настајању слободних радикала у организму, важну улогу имају метали са променљивом валентношћу, првенствено гвожђе, протеини укључени у везивање гвожђа (трансферин, церулоплазмин) доприносе антиоксидационој заштити организма (2).

Последњи ниво антиоксидационе заштите остварују ензимски антиоксиданси, који учествују у репарацији насталог оксидационог оштећења липида, протеина, нуклеинских киселина (разни протеолитички ензими, фосфолипаза А<sub>2</sub>, DNK-лигазе, DNK-полимеразе и други).

Табела 1. - Антиоксиданси у биолошким системима.

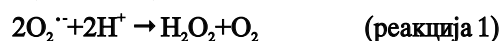
ANTIOKSIDANS	OSOБINE
<i>Enzimski antioksidansi</i>	
Супероксид дизмутаза (SOD)	Cu-, Zn- или Mn-зависне; цитосолне, митохондријске и ванћелијске; дизмутација O <sub>2</sub> у H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и O <sub>2</sub>
Глутатион пероксидаза (GPx)	Se-ензими, не Se-ензими (неке глутатион S-трансферазе); цитосолне, митохондријске и ванћелијске; редукују водоник пероксид, органске хидропероксиде и хидропероксиде масних киселина
Каталаза	хем-ензим; пероксизоми и митохондрије; разлаже водоник пероксид до H <sub>2</sub> O и O <sub>2</sub>
<i>Помоћни ензими</i>	
Глутатион редуктаза (GSR)	преводи GSSG у GSH
NADPH-хинон оксидоредуктаза	доприноси смањењу стварања кисеоничних слободних радикала
Хидроксилаза епоксида	доприноси смањењу стварања кисеоничних слободних радикала
UDP-глукуронилтрансфераза	ензим коњугације
Сулфонил трансфераза	ензим коњугације
Глутатион-S-трансфераза (GST)	катализује коњугацију R-OOH са GSH
Дехидрогеназа глюкозо-6-P	донор NADPH
Дехидрогеназа 6-фосфоглуколата	донор NADPH
Дехидрогеназа изоцитрата	донор NADPH
Трансхидрогеназе	донор NADPH
Транспортни систем	за GSSG
Транспортни систем	за коњугате ксенобиотика
<i>Не-ензимски антиоксиданси</i>	
α-токоферол (vitamin E)	липосолубилан; везан за мембрану; scavenger перокси радикала, лимитира процес липидне пероксидације
Каротеноиди (β-каротен)	провитами А, липосолубилан; scavenger синглет кисеоника
Аскорбинска киселина (vitamin C)	хидросолубилна; регенерише -токоферол, сцавенгер слободних радикала, редукује перокси радикал (LOO).
Глутатион (GSH)	хидросолубилан; редуција G-S-S-G у G-SH, scavenger слободних радикала, кофактор GPx и GST.
Мокраћна киселина	плазма; сакупљач слободних радикала, везује јоне гвожђа и бакра
Албумин	плазма; везује јоне бакра, реагује са HOCl, неутралише перокси радикал
Церулоплазмин	плазма; везује јоне бакра, има ферооксидазну активност (Fe(II)Fe(III)).
Трансферин	плазма; везује фери (III) јоне, инхибира гвожђем изазвану липидну пероксидацију
Лактоферин	плазма; везује гвожђе
Билирубин	плазма; сцавенгер перокси радикала
Мелатонин (N-acetil-5-metoksi triptamin)	плазма; неутралише хидроксил радикал, хипохлорну киселину и перокси радикале
Полиамини (spermin, spermidin и putrescin)	плазма; везују гвожђе; реагују са синглет кисеоником, супероксид анјоном и перокси радикалом

**Ензимски антиоксидациони систем**

Антиоксидациони ензими чине прву линију одбране од кисеоничних слободних радикала и учествују у елиминацији примарних производа парцијалне редукције молекулског кисеоника. Superoksid dizmutaza (SOD) преводи супероксид анјон у H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> се каталитичком активношћу глутатион пероксидазе или каталазе редукује у воду.

**SUPEROKSID DIZMUTAZA (SOD)**

Superoksid dizmutaza (superoksid: superoksid oksidoreduktaza, EC 1.15.1.1) катализује реакцију дизмутације супероксидних радикала, у присуству донора водоника до водоник пероксида и O<sub>2</sub> (3), при чему се је дан молекул O<sub>2</sub><sup>•-</sup> оксидује у O<sub>2</sub>, а други редукује у водоник пероксид (реакција 1):



Брзина ензимске реакције је за око 1000 пута већа од спонтане дизмутације супероксид анјон радикала.

Код човека су присутне три изоензимске форме SOD:

1. Cu/Zn-SOD (бакар, зинк-зависна SOD)
2. Mn-SOD (манган-зависна SOD)
3. EC SOD (екстрацелуларна SOD) (4,5).

*Cu/Zn-SOD* се највећим делом налази у цитозолу ћелија. Овај ензим је по структури хомодимер у коме свака субјединица садржи по један атом  $\text{Cu}^{+2}$  и један атом  $\text{Zn}^{+2}$  (6). Јони бакра чине активни центар, а јони цинка стабилизују просторну конфигурацију ензима. Каталитичка активност *Cu/Zn-SOD* везана је за бакар, који је одговоран за реакцију дизмутације у којој мења своју валенцу, примањем или отпуштањем електрона.

*Манган-зависна SOD* се налази у матриксу митохондрија (3,5). Имунохистохемијским методама нађено је да је Mn-SOD присутна у многим хуманим ткивима, осим у еритроцитима. Овај ензим, изолован из хуманих ткива је тетрамер, који садржи 2-4 атома мангана. У току реакције дизмутације, коју катализује SOD, Mn (као и Cu у *Cu/Zn-зависној SOD*) мења своју валенцу. Специфичност митохондријске SOD је индукција њене ензимске активности различитим факторима (радијацијом, -интерфероном, -интерлеукином, липополисахаридима и др.).

Назив *екстрацелуларна SOD* базиран је на присуству ензима у међућелијском простору и екстрацелуларној течности (плазма, лимфа, синовија, ликвор) (5). EC SOD је тетрамерни гликопротеин, чији активни центар чине јони  $\text{Cu}^{+2}$ . Екстрацелуларна SOD показује велики афинитет за киселе гликозминогликане, пре свега за хепарин, за који се везује екстрацелуларно (7). Овај изоензим SOD синтетишу фибробласти, глијалне ћелије, макрофаги, хондроцити и ендотелне ћелије (8). EC SOD, осим што утиче на концентрацију  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , регулише и дејство NO, који се синтетише у макрофагима, ендотелним ћелијама у периферној крви и другим ћелијама (9). Пораст активности EC SOD доводи до интензивнијег уклањања супероксид анјона, чиме се пролонгира дејство NO, као посредника у мишићној релаксацији, неуротрансмисији или ћелијској сигнализацији. Обратно, смањена активност EC SOD и последично повећана концентрација  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , интензивира настајање пероксинитрата ( $\text{NO}^{\cdot} + \text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{ONOO}^{\cdot}$ ;  $\text{ONOO}^{\cdot} + \text{H}^+ \text{OH}^{\cdot} + \text{NO}_2$ ), који могу иницирати општећење ткива. EC SOD је веома заступљена у зидовима крвних судова, нарочито артерија, где су главни извор овог ензима ћелије глатких мишића (9). Екстрацелуларна SOD је ензим који штити липопротеине мале густине (LDL) у циркулацији од оксидације и измерена је смањена активност овог ензима код пацијената са коронарном артеријском болешћу (10).

#### GLUTATION PEROKSIDAZA (GSH-Px)

Глутатион пероксидазе чине фамилију ензима који катализују редукцију водоник пероксида или органских хидропероксида у одговарајући алкохол, користећи редуктовани глутатион као дозор водоника (11) (реакција 2):



Активношћу глутатион редуктазе врши се стална регенерација редуктованог глутатиона (реакција 3):



На основу супстратне специфичности и захтева са селеном, идентификоване су селено-зависне (класична глутатион пероксидаза, фосфолипид-зависна глутатион пероксидаза и глутатион пероксидаза плазме) и селено-независне глутатион пероксидазе (селен независна GSH-Px присутна у цитозолу јетре и Се-независна GSH-Px крвне плазме). Селен независне глутатион пероксидазе имају мањи афинитет за  $\text{H}_2\text{O}_2$ , али су ефикасне у редукцији органских хидропероксида.

*Класична селен зависна глутатион пероксидаза (GSH-PX)* је тетрамер, у коме свака субјединица садржи по један атом селена у форми селеноцистеина. GSH-Px редуктује липидне хидропероксиде до одговарајућих хидрокси-масних киселина, а затим регенерише своју нативну форму помоћу редуктованог глутатиона (12). Разлика у кинетичким својствима GSH-Px и каталазе условљава већи афинитет GSH-Px за супстрат -  $\text{H}_2\text{O}_2$  у односу на каталазу, када је водоник пероксид присутан у малим концентрацијама у ћелији или у плазми. Међутим, када је концентрација водоник пероксида у ћелијама висока, каталаза је ефикаснија у његовој детоксикацији од GSH-Px.

Висока активност GSH-Px присутна је у цитозолу (65-70%) и митохондријама (28-30%).

*Фосфолипидзависна глутатион пероксидаза (PH GSH-PX)* је мономер у чијем се активном центру налази један атом селена. Овај ензим може да редуктује фосфолипидне хидропероксиде, холестерол хидропероксиде и водоник хидро пероксид, а има способност да реагује директно са фосфолипидним хидропероксидима у ћелијској мембрани, без претходног деловања фосфолипазе  $\text{A}_2$  (13).

*Глутатион пероксидаза плазме* - активност глутатион пероксидазе крви односи се на два ензима (селенопротеина): GSH-Px присутна у плазми и GSH-Px присутна у еритроцитима (4). Селен-зависна GSH-Px плазме може да редуктује липидне хидропероксиде и водоник пероксид и сматра се да је овај ензим одговоран за детоксикацију водоник пероксида и органских хидропероксида, који настају у процесу синтезе еикосаноида у ендотелним ћелијама. Код људи глутатион пероксидаза плазме углавном води порекло из бубрега (14).

KATALAZA ( $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  оксидоредуктаза; EC 1.11.1.6) је један од најраспрострањенијих ензима у природи, чија је основна биолошка улога разлагање токсичног водоник пероксида (реакција 4):



Каталаза разграђује водоник пероксид до воде и молекулског кисеоника, при чему се у зависности од концентрације супстрата, одвија каталазна или пероксидазна тип реакције (4). У оба случаја реакција почиње образовањем **kompleksa I** између каталазе и молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  (реакција 5). У каталазном типу реакције, **kompleks I** као дозор водоника користи други молекул

водоник пероксида, при чему настају вода и молекулски кисеоник (реакција 6):

Каталаза + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → каталаза H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kompleks I) (реакц. 5)

Каталаза - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → каталаза + 2H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub> (реакц. 6)

У пероксидазном типу реакције, донори водоника или електрона могу бити различита органска и неорганска једињења (етанол, метанол, формалдехид и др.) са којима реагује комплекс I, а из реакције излази активни ензим, оксидисани кофактор и вода (реакција 7):

AH<sub>2</sub> + каталаза - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → каталаза + A + 2H<sub>2</sub>O (реакц. 7)

Каталаза је хемопроteid, састављен од четири идентичне субјединице, у чијем се саставу налази по један хем, са Fe<sup>2+</sup> у центру (15). Каталаза је присутна у свим ткивима сисара, а у ћелијама је претежно локализована у пероксизомима и митохондријама. У пероксизомима каталаза постоји у два облика: као солубилна и као форма везана за мембрану пероксизома. Присуство каталазе у пероксизомима, где под утицајем пероксизомалних ензима настаје водоник пероксид, омогућава заштиту овог дела ћелије, док у другим деловима ћелије има мање каталазе, па улогу у детоксикацији H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> преузимају други ензими (пероксидазе).

Урођени недостатак каталазе се наслеђује аутозомално рецесивно и зове се акаталаземија. Ови болесници су најчешће без симптома.

С обзиром да супероксид дизмутаза редукује супероксид анјон у водоник пероксид, који може бити преведен у токсични хидрокси радикал (OH<sup>•</sup>), неопходно је да SOD, с једне стране и глутатион пероксидаза или каталаза, с друге стране делују синхронизовано. У случају да је повећана активност SOD у односу на активност глутатион пероксидазе и/или каталазе долази до нагомилавања водоник пероксида. Док је последица смањене активности SOD у односу на активност глутатион пероксидазе и/или каталазе нагомилавање O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Сваки поремећај равнотеже између ових антиоксидационих ензима је, дакле непожељан и штетан.

За детоксикацију кисеоничних слободних радикала неопходни су и други помоћни ензимски системи. Како је за функционисање глутатион пероксидазе потребан редуковани глутатион, један од помоћних ензимских система је систем за регенерацију редукованог глутатиона, у коме глутатион редуктаза има кључну улогу. Ензими који каталишу реакције стварања NADPH (деhidрогеназа глукозо-6-фосфата, деhidрогеназа 6-фосфоглуконата, деhidрогеназа изоцитрата), такође, су део овог помоћног антиоксидантног ензимског система, јер је NADPH неопходан за активност глутатион редуктазе.

Други помоћни ензими су они који каталишу реакције које доприносе смањеном стварању слободних радикала кисеоника (NADPH-оксидоредуктазе хинона, хидроксилазе еоксида), као и ензими који коњугирају токсичне интермедијере у метаболизму ксенобиотика (глутатион S-трансферазе, сулфонил трансферазе, UDP-глукуронил трансферазе).

## GLUTATION-S-TRANSFERAZA (GST)

Glutation-S-transferaza (GST) (EC 2.5.1.18) обухвата фамилију мултифункционалних ензима, чија је најважнија улога у процесима детоксикације, затим су важне транспортна и синтетска улога ових ензима (16, 17). GST катализује реакцију коњугације глутатиона са бројним хидрофобним и електрофилним токсинима (канцерогени, хербициди, пестициди, фармаколошки активне супстанце) и ендогеним електрофилима, који су најчешће продукти оксидационог стреса (липидни хидропероксиди и крајњи продукти липидне пероксидације) (4). GST може послужити и као везујући протеин за стероиде, билирубин и неке лекове (тетрациклине), чиме олакшава њихов транспорт. Синтетску улогу GST остварује учешћем у синтези леукотриена C<sub>4</sub> и неких простагландина.

Код сисара, GST се налази у свим ткивима и органима, а код људи GST је доказана у јетри, плућима, бубрезима, еритроцитима, леукоцитима и др. органима. У хуманим ћелијама, GST изоензими су превасходно локализовани у цитозолу и према класификацији Halliwella и Gutteridgea из 1999. године, груписани у шест класа. Структурно, цитоплазматски GST изоензими су димери, а међусобно се разликују према изоелектричним тачкама, молекулским масама и специфичности према супстрату.

## Не-ензимски антиоксидациони систем

Ензимски антиоксидациони систем допуњују различита редукована средства присутна у биолошким мембранама (α-токоферол, мање витамин А и каротеноиди) и у цитозолу (vitamin C, редуковани глутатион).

## ТОКОФЕРОЛ (VITAMIN E)

У условима неконтролисаног стварања слободних радикала кисеоника, почетна оштећења ћелије се дешавају у ћелијској мембрани. Зато је неопходно присуство липосолубилних антиоксиданаса у самој ћелијској мембрани. Присуство липосолубилних антиоксиданаса, такође је неопходно и у липопротеинима мале густине (LDL). Главни липосолубилни антиоксиданс који штити биомембрану и липопротеине мале густине (LDL) је α-токоферол (18).

Алфа токоферол (витамин E) је најефикаснији мембрански антиоксиданс (прекида ланац пероксидације липида) (19). У биолошким мембранама се на око 2100 молекула полинезасићених масних киселина налази по један молекул α-токоферола, док је у липопротеинима плазме тај однос 1:200. У реакцији са липид пероксид радикалима, витамин E их редукује и преводи у незасићене масне киселине или хидропероксиде незасићених масних киселина, а сам прелази у токоферол радикал, који је много мање реактиван у односу на перокси радикал (реакција 8):

ROO<sup>•</sup> + vitE-OH<sup>•</sup> → ROOH + vitE-O (реакција 8)

Настали токоферол радикал реагује даље, са још једним липид перокси радикалом (ROO) са којим формира неактиван оксидациони продукт (реакција 9):

$\text{VitE-O}^{\cdot} + \text{ROO}^{\cdot} \rightarrow \text{ROOH} + \text{neaktiv. produkt}$  (reakц. 9)

Настали оксидовани продукти токоферола (vitE-O), регенерацијом, под дејством аскорбата, поново прелазе у редуковане форме (vitE-OH) које спречавају настајање и гомилање хидропероксида незасићених мањних киселина, чиме се инхибира процес пропагације пероксидације липида и остварује улога токоферола у стабилизацији биомембрана. Друга могућност регенерације токоферол радикала јесте реакција са убихиноном (20).

Витамин Е обухвата осам структурних изомера токоферола и токотриенола различите биолошке активности, а у организму човека је у погледу количине и активности доминантан  $\alpha$ -токоферол (21). Биосинтеза витамина Е се одиграва у хлоропластима зелених биљака, док људски организам не поседује способност синтезе овог витамина. Главни извори витамина Е у људској исхрани су биљна уља и липиди морских организама. Дневне потребе човека за витамином Е су мале (неколико десетих, па чак и стотих делова милиграма).

Бројне клиничке и епидемиолошке студије потврђују антиоксидациона својства витамина Е у превенцији и смањењу компликација у кардиоваскуларним болестима, атеросклерози, исхемијско-реперфузионим општењима ткива, карциному (22).

### KAROTENOIDI

Каротеноиди су пигменти који се синтетишу у биљним и бактеријским организмима. Познато је око 600 каротеноида, од којих педесетак имају особине провитамина А. У људској исхрани је најзаступљенији бета каротен, који има активност провитамина А. У организму човека каротеноиди и витамин А остварују антиоксидациону активност, имуностимулаторна својства и антимутагено (антиканцерско) деловање. Бета каротен је липосолубилни антиоксиданс, који неутралише синглет кисеоник, а витамин А неутралише тиолове радикале (23, 24). Каротеноиди показују синергистичко дејство са витамином Е.

Неки каротеноиди који немају провитаминску активност (нпр. ликопен), такође показују протективне ефекте на деловање слободних радикала и имају антиканцерску активност.

### L-ASKORBINSKA KISELINA (VITAMIN C)

L-Askorbinska kiselina, због своје хидросолубилне природе, је доминантан антиоксиданс у екстрацелуларној течности и цитосолу. За разлику од неких сисара човек не синтетише vitamin C, тако да концентрација овог витамина у телесним течностима и ћелијама (као и vitamina E) зависи од пероралног уноса. Човек потребе за vitaminom C задовољава из хране биљног порекла, а дневним уносом од 140 до 150 мг засићују се потребе ткива за овим витамином. При уносу већих доза vitamina C у организам интензивира се његова елиминација преко бубрега.

Захваљујући својству да лако отпушта два водоникова атома, аскорбинска киселина има улогу снажног редокс система. У присуству ваздуха и других оксидишу-

ћих агенаса, L-askorbinska kiselina се брзо оксидује у dehidroaskorbinsku kiselinu, која може поново да се редукује у енолни облик L-askorbinske kiseline.

Активност vitamina C, као антиоксиданса, базирана је на његовој способности да неутралише бројне интермедијере и продукте слободно-радикалских процеса, при чему се оксидује у dehidroaskorbinsku kiselinu. Аскорбинска киселина редукује перокси радикале (LOO), реагује са супероксид анијон и хидроксил радикалом, неутралише синглет кисеоник. Vitamin C је врло ефикасан инхибитор липидне пероксидације у *in vivo* условима. Бројна истраживања испитују улогу vitamina C у антиоксидационој заштити липопротеина мале густине (LDL). Познато је, да је висок серумски ниво LDL-а фактор ризика за настанак атеросклерозе, али новија истраживања указују на атерогено својство оксидоване форме LDL-а. Наиме, malondialdehyd и неки други продукти липидне пероксидације, модификују апов protein липопротеина мале густине, што води ка настанку оксидационо модификованог LDL-а. Даље његова акумулација у макрофагним ћелијама и њихова трансформација у »пенушаве« ћелије су обележја атеросклеротског процеса. Значајно, у овој оксидационој хипотези атеросклерозе, је да антиоксиданси који инхибирају оксидациону модификацију LDL-а могу спречити или успорити прогресију атеросклерозе (25). Антиоксидантни ефекат vitamina C у крвној плазми и брзина његове реакције са перокси радикалом, већи су у односу на друге антиоксидансе (тиоли, -токоферол, мокраћна киселина).

Синергистичко антиоксидационо дејство између vitamina C и vitamina E се огледа у способности vitamina C да редукује токоферол радикал до  $\alpha$ -токоферола, у присуству ензима NADH askorbat reduktaze.

Аскорбинска киселина међутим, поседује и прооксидациона својства, која се огледају у способности овог витамина да редукује метале променљиве валенце (гвожђе). Пошто се гвожђе у организму налази у ћелијским депоима и транспортним протеинима, у физиолошким условима доминира антиоксидациона улога vitamina C.

### GLUTATION

Глутатион (GSH) - трипептид (-L-glutamyl-L-cisteinil-glicin), најраспрострањенији унутарћелијски тиол је сулфхидрилни антиоксиданс (-SH) и ензимски кофактор (26). Синтеза глутатиона одвија се у оквиру тзв. -глутамил циклуса у ћелијама свих органа, нарочито јетре, кроз две ензимски катализоване реакције (ензимима -глутамил цистеин синтетаза и глутатион синтетаза) уз утрошак АТФ-а. У ћелијама је глутатион присутан у слободном облику (редуковани глутатион - GSH антиоксиданс или оксидовани облик GSSG) и у облику везаном за протеине као тзв. глутатионилирани протеини (26,27). Највећим делом је глутатион унутар ћелија присутан као GSH, док оксидовани облик глутатиона у ћелијама здраве особе ретко прелази 10% количине укупног глутатиона.

Важна особина молекула GSH је висок редокс потенцијал(27). Ова особина је одговорна за биохемиј-

ску активност глутатиона, тј. одређује GSH као снажног антиоксиданса и кофактора за ензимске реакције у којима је неопходан тзв. редукујући еквивалент. Иако се улога глутатиона најчешће везује за заштиту ћелија од активних слободних радикала, глутатион учествује и у детоксикацији ксенобиотика, синтези еикозаноида, синтези нуклеинских киселина и протеина, у ћелијској сигнализацији, пролиферацији и диференцијацији. У антиоксидационој заштити глутатион учествује директно и индиректно, као кофактор ензимских антиоксиданаса: glutatin-peroksidaze, glutation S-transferaze, glutation reduktaze, glutation transhidrogenaze. Поред одржавања протеина ћелијске мембране у редукованом облику, глутатион кроз систем антиоксидационе заштите обезбеђује интегритет ћелијске мембране и њено нормално функционисање (активни транспорт супстрата и јона, транспорт аминокиселина и др) (4).

GSH као редуценс, антиоксиданс и детоксикациони агенс има важну улогу у одржавању здравља. Ниска концентрација GSH и висока вредност односа GSSG/GSH забележена је у многим болестима (28). Документоване су смањене концентрације глутатиона везане за процес старења (28). Особе старосног доба 20-39 година имају за 17% веће концентрације GSH у крви од особа старосног доба 60-79 година. Даље, смањене концентрације GSH везане су за патогенезу различитих болести: јетре (нпр. алкохолна болест јетре и неалкохолна цироза јетре) (29), плућа (астма, хронична опструктивна болест плућа, идиопатска фиброза плућа) (30), неуродегенеративне болести (Паркинсонова болест, Alzheimerova bolest) (31), аутоимуне болести, атеросклерозне промене, карцином и друге.

Будући да концентрација глутатиона у крви добро одражава статус глутатиона у другим мање приступачним ткивима, одређивање концентрације GSH и GSSG и њиховог односа у крви, сматра се важним показатељем укупног телесног статуса глутатиона и често је циљ у оквиру испитивања оксидационог стреса и патологије слободних радикала.

Мокраћна киселина и билирубин су, такође, део не-ензимског антиоксидантног система крвне плазме. Мокраћна киселина (крајњи продукт метаболизма пурина) је хватач синглет кисеоника, пероксил радикала и хидроксил радикала (32). Билирубин инхибира процес липидне пероксидације у крвној плазми и изолованим липопротеинима мале густине (LDL), највероватније у садејству са  $\alpha$ -токоферолом (33).

## ЗАКЉУЧЦИ

Оксидациони стрес има значајну улогу у биолошким процесима у ћелији. Сматра се да је оксидациони стрес један од узрочника бројних биолошких и патолошких процеса попут старења, запаљења, карциногенезе, исхемије-реперфузије, као и низа обољења попут дијабетеса мелитуса, атеросклерозе, неуродегенеративних болести. Зато су истраживања деловања оксиданаса и антиоксиданаса неопходна за разумевање механизма настанка и прогресије различитих болести, као и за развијање нових терапијских стратегија у њиховом лечењу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intens and Crit Care Nurs*, 2005; 21: 24-28.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 1990; 280: 1-8.
3. Fridovich J. Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem*, 1997; 272: 18515-517.
4. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. *Biohemija slobodnih radikala*, 2000; Medicinski fakultet, Niš.
5. Nozaik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Intern J of Biochem & Cell Biol*, 2005; 37: 2466-2471.
6. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 10405-409.
7. Lookene A, Stenlund P, Tibell LA. Characterization of heparin binding of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem*, 2000; 39: 230-236.
8. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J*, 1990; 266: 213-219.
9. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*, 1996; 75: 617-636.
10. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: Relation to endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*, 2000; 19: 2264-2270.
11. Yu H, Liu J, Lui X, Zang T, Luo G, Shen J. Kinetic studies on the glutathione peroxidase, activity of selenium - containing glutathione transferase. *Compar Biochem and Physiol*, 2005; 141: 382-389.
12. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione Peroxidase Isolated from Plasma Reduces Phospholipid Hydroperoxides. *Arch of Biochem and Bioph*, 1993; 305(2): 541-545.
13. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 2003; 34(2): 146-169.
14. Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y, et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron*, 1996; 73: 207-211.
15. Vetrano AM, Heck DE, Mariano ThM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *J Biol Chem*, 2005; 280(42): 35372-381.
16. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, 1997; 10: 2-8.
17. Oakley AJ. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin in Struct Biol*, 2005; 15: 1-8.
18. Li D, Deveraj S, Fuller C, Bucala R, Jialal J. Effect of -tocopherol on LDL oxidation and glycation: in vitro and in vivo studies. *J Lipid Res*, 1996; 37: 1978-86.
19. Dutta A, Dutta SK. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. *J Am Coll Nutr*, 2003; 22: 258-68.
20. Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*, 2005; 49: 7-30.
21. Brigelius-Flohe R, Traber MG, Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 1999; 13: 1145-55.
22. Tucker JM, Townsend DM. Alpha tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed & Pharmacoth*, 2005; 59: 380-387.

23. Agamey AE, Lowe GM, Mc Garvey DJ, Mortensen A, et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/prooxidant properties. *Arch of Bioch and Bioph*, 2004; 430: 37-48.
24. Rautalahti M, Huttunen J. Antioxidants and carcinogenesis. *Ann Med*, 1994; 26: 435-41.
25. Brown DJ, Goodman J. A review of vitamins A, C, and E and their relationship to cardiovascular disease. *Clin Excell Nurse Pract*, 1998; 2(1): 10-22.
26. Kidd PM. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev*, 1997; 2(3): 155-76.
27. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39.
28. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW. Glutathione in human plasma: decline in association with ageing, agerelated macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 1998; 24: 699-704.
29. Hadi YM, Kacmaz M, Oztruk SH. Antioxidant status of erythrocytes from patients with cirrhosis. *Hepato-Gastroenterol* 1999; 46: 2460-3.
30. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Resp J*, 2000; 16: 534-554.
31. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*, 2000; 267: 4904-11.
32. Ames B, Cohen G, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused ageing and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 6858-71.
33. Mohr D, Stocker R. Selective and sensitive measurement of vitamin C, ubiquinol-10, and other low-molecular-weight antioxidants. In: Punched NA and Kelly FJ eds. *Free radicals: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1996; 271-285.