



*Katedra za medicinsku biohemiju*

**Reaktivne hemijske vrste i oksidativni stres**

**Slobodni radikali**

**Stvaranje reaktivnih vrsta/slobodnih radikala u  
organizmu**

**Najznačajnije reaktivne vrste**

**Pojam oksidativnog stresa**

doc. Dr Snežana Pantović

# Uvod

- Prisustvo slobodnih radikala u biološkom materijalu otkriveno je kasnih 1950-ih godina prošlog vijeka
- Nešto kasnije pojavila se hipoteza Denhama Harmana da kiseonični radikali nastaju kao sporedni produkti enzimski kontrolisanih reakcija
- Opisani su kao *Pandorina kutija zla*-odgovorna za nastanak brojnih ćelijskih oštećenja, mutagenezu, kancere i sl.
- Slobodni radikali mogu biti medijatori mnogih patoloških stanja: diabetes mellitusa, HIV infekcija, autoimunih bolesti, neurodegenerativnih, plućnih bolesti..
- Jednom pokrenut lanac reakcija SR ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta
- SR remete ćelijsku morfologiju, funkciju, jonsku homeostazu, enzimsku aktivnost..

- **Fiziološka funkcija**- metabolizam prostaglandina, regulacija ćelijske signalizacije, aktivacija ćelijskih receptora, eritropoeza, kontrola disanja..
- **U monocitima, makrofazima i eozinofilima**- reaktivne kiseoničke vrste služe kao agensi za uništavanje virusa i bakterija
- **Apoptoza**-indukovana procesima oksidativnog stresa
- **Postoji sistem antioksidativne zaštite** - kod aerobnih ćelija sastavljen od enzimskog i neenzimskog dijela

enzimski	neenzimski
Superoksidna dismutaza	Peptidi sa SH grupama: glutation, metalotioneini
Katalaza	Vitamin E
Glutation peroksidaza	Vitamin C
Glutation reduktaza	Koenzim Q
	Urea Neki proteini



**HEALTHY  
ATOMS**



**FREE  
RADICALS**



**ANTIOXIDANTS**

# Slobodni radikali

- **Definicija i nomenklatura slobodnih radikala**
- *SR- atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj molekularnoj, odnosno atomskoj orbitali*
- Hemijski naziv SR podrazumijeva nastavak- *li*
- Ukoliko su radikali intermedijeri u nekim hemijskim reakcijama preporučuje se da se ispred riječi radikal koristi naziv- *vezani*
- Slobodni radikali se obilježavaju tačkom u superskriptu ispred naelektrisanja- npr. superoksid anjon radikal –  $O_2^{\circ-}$

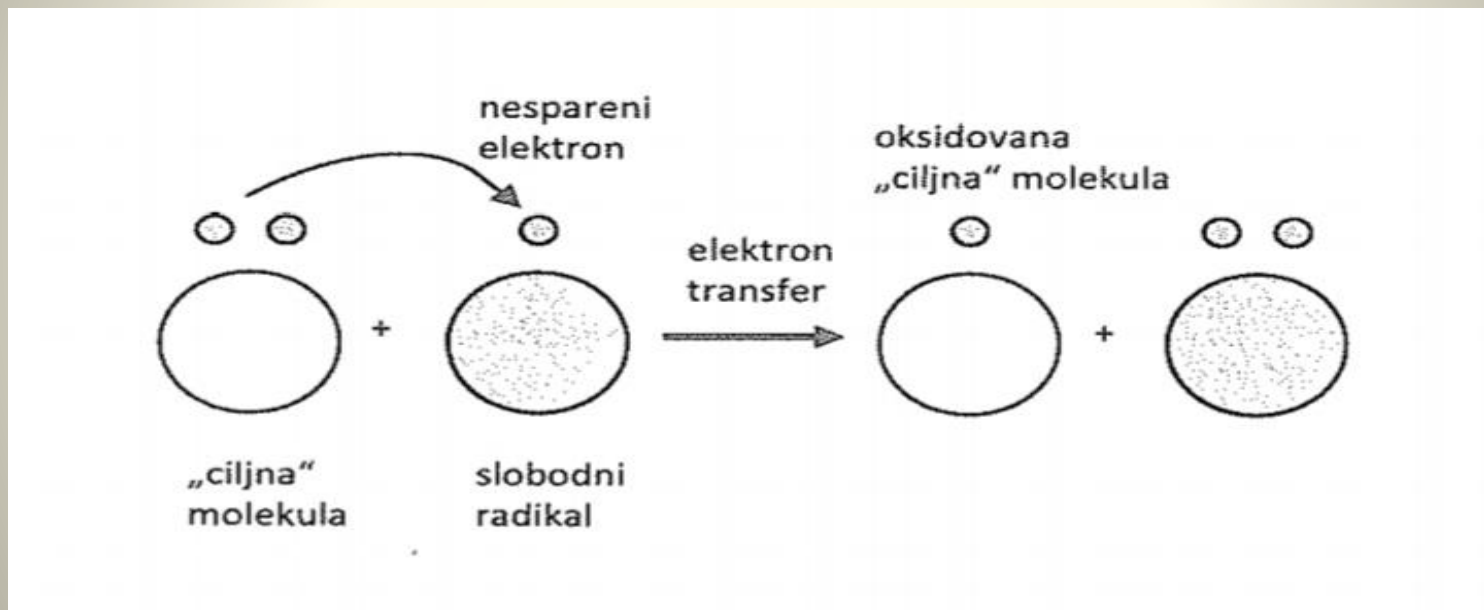


## ***Osobine i otkriće slobodnih radikala***

- Vrlo reaktivne forme zbog prisustva nesparenih elektrona
- Usled prisustva nesparenog elektrona posjeduju paramagnetske karakteristike i detektuju se elektron paramagnetnom rezonantnom spektrometrijom
- **SR-** stupaju u reakcije: supstitucije, adicije, eliminacije, izomerizacije, rekombinacije, disproporcijacije
- *Postoje i neki tipovi neradikalnih reakcija sa makromolekulima-tada se koriste kao spin-markeri koji omogućavaju proučavanje makromolekula zakačenih za ove SR*
- ***veoma brzo stupaju u interakcije sa svim tipovima biomolekula iz okruženja (lipidi, proteini, DNK), što za posledicu ima sveukupno oštećenje ćelijske funkcije!***

# Mehanizam djelovanja slobodnih radikala

- Usled potrebe za nesparenim elektronom (elektronima) u poslednjoj orbitali, ponašaju se kao jaki elektrofili-**oksidacioni agensi**



U reakciji sa supstratom, odnosno donorom elektrona, SR se redukuju i gube karakter SR a supstrat se oksiduje i postaje SR druge generacije-**sekundarni SR**

# Reaktivne vrste

- u literaturi je pojam reaktivna vrsta-RS više zastupljen u odnosu na SR
- Sva jedinjenja visokog elektrofilnog karaktera koja imaju sklonost oksidativnog/nitronizovanog oštećenja ćelija
- Po hemijskoj strukturi RV mogu biti: molekuli, joni i sami SR
- molekuli: vodonik peroksid,  $H_2O_2$
- Joni: peroksinitritni anjon,  $ONOO^-$





*Tabela 1. Reaktivne vrste*

	Radikali		Neradikali	
ROS	$O_2^{\bullet-}$	superoksil anjon radikal	$H_2O_2$	vodonik peroksid
	$HO^\bullet$	hidroksil radikal	$HOCl$	hipohlorna kiselina
	$ROO^\bullet$	peroksil radikal	$O_3$	ozon
	$RO^\bullet$	alkoksil radikal	$^1O_2$	singlet kiseonik
	$HOO^\bullet$	hidroperoksil radikal		
RNS	$NO^\bullet$	nitroksil radikal	$NO_2^-$	azotdioksid anjon
	$NO_2^\bullet$	azot dioksid radikal	$N_2O_3$	azot trioksid
			$NO_2^+$	nitronijum (nitril) jon
			$ONOO^-$	peroksinitrit anjon
			$ROONO$	alkil peroksinitrit
			$NO^-$	(singlet) nitroksil anjon
			$NO^+$	nitrozil katjon
			$NO_2Cl$	nitril hlorid
RCS	$R^\bullet$	alkil radikal		
	$RO^\bullet$	alkoksil radikal		
	$ROO^\bullet$	peroksil radikal		
RSS	$RS^\bullet$	tiil radikal		
	$GS^\bullet$	glutatiil radikal		
	$GSSG^{\bullet-}$	diglutiil anjon radikal		

- U zavisnosti od konfiguracije aktivnog centra u RS oni se dijele na RS sa: **kiseonikom, azotom, ugljenikom, sumporom**
- Primarni RS započinju lančane reakcije sa biomolekulima
- Reaktivnost RS je u negativnoj korelaciji sa poluživotom, tj. ako je neka RS kratkoživeća tada je više reaktivna tj. nestabilna i vrlo neselktivna
- RS remete strukturu: proteina, lipida, hromatskog materijala kao i signalnu transdukciju i ekspresiju gena

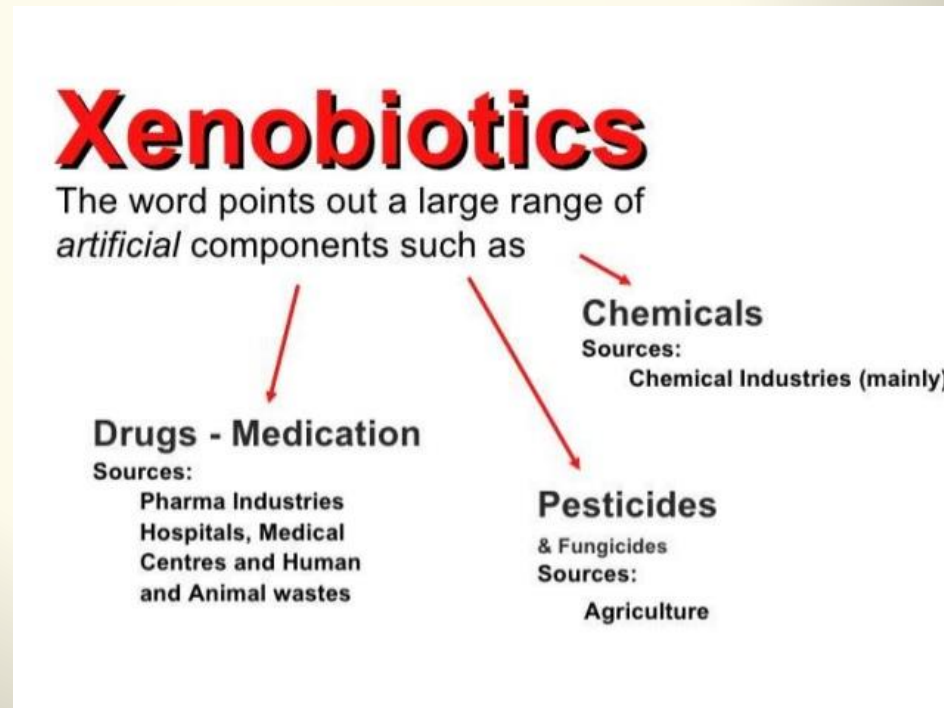
*Tabela 2. Procena poluživota reaktivnih vrsta (Sies, 1993)*

Reaktivne vrste		Poluživot
Formula	Naziv	$t_{1/2}$
HO <sup>•</sup>	hidroksil radikal	10 <sup>-9</sup> s
RO <sup>•</sup>	alkoksil radikal	10 <sup>-6</sup> s
ROO <sup>•</sup>	peroksil radikal	7 s
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik peroksid	enzimski
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksil anjon	enzimski
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletni kiseonik	10 <sup>-5</sup> s
Q <sup>•</sup>	semihinonski radikal	dani
NO <sup>•</sup>	azot oksidni radikal	1 - 10 s
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitritni anjon	0,05 - 1 s

# Stvaranje reaktivnih vrsta/slobodnih radikala u organizmu

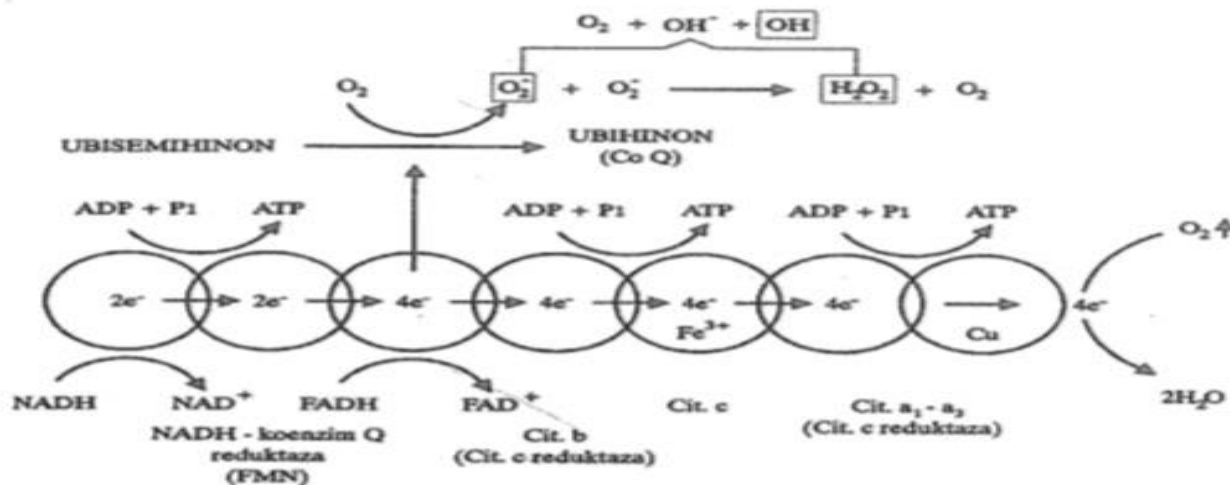
- Slobodni radikali se u organizmu stvaraju:
- **1. u fiziološkim uslovima tokom:**
- *a) procesom oksidativne fosforilacije u mitohondijama tj. ćelijskog disanja*
- *b) oksidoredukcije u prisustvu metala sa promjenjivom valencom*
- *c) autooksidacije brojnih malih molekula (npr. dopamin u mozgu)*
- **2. u inflamaciji –proces fagocitoze**
- **3. u bolestima:**
- *a) autoimune bolesti*
- *b) neurodegenerativne*
- *c) maligne*
- *d) kardiovaskularne*
- *e) profesionalna oboljenja povezana sa toksičnim supstancama*
- *f) ishemija, hipoksija, hiperoksija-stanja*

- **4. biotransformacijom ksenobiotika** (u ER posredstvom sistema mješovitih oksidaza)
- a) tokom metabolisanja egzogeno unijetih jedinjenja-hrana, lijekovi
- b) ekspozicija toksičnim jedinjenjima
- c) dejstvo spoljašnjih faktora sredine-UV zraci, jonizujuće, aerozagađenje..
- **5. pri pojačanoj fizičkoj aktivnosti**
- **6. pri trovanjima**



## Proces oksidativne fosforilacije

- Najznačajniji izvor stvaranja ROS predstavlja proces ćelijskog disanja
- 90% unijetog molekularnog kiseonika dopijeva u mitohondrije
- U procesu ĆD odvija se četvero-elektronska redukcija  $O_2$  do  $H_2O$  a energija oslobođena u procesu prenosa elektrona se koristi za sintezu ATP-a
- Nestabilne veze između elektrona i enzima dovode do *curenja* elektrona i nastanka ROS
- Respiratorni lanac-najznačajni izvor kiseoničkih radikala




Slika 2. Oksidativna fosforilacija

# ***Biotransformacija ksenobiotika***


- Tokom metabolizma brojnih endogenih i egzogenih jedinjenja u ER, posredstvom mješovitih oksidaza stvaraju se slobodni radikali
- Ljekovi, hrana, pesticidi, metali, UV zraci, zagađenost, duvanski dim..
- Od endogenih jedinjenja za stvaranje ROS najznačajniji je dopamin-autooksidacija u CNS-u
- Ljekovi: antibiotici(aminoglikozidi, tetraciklini), analgoantipiretici(aspirin), organski nitrati u terapiji angine, antiepileptici, antituberkulotici, anestetici..
- Alkoholizam takođe uziče na stvaranje radikala

**TYPES OF XENOBIOTICS**




**Exogenous:**

- Drugs
- Food additives
- Pollutants
- Insecticides
- Carcinogens



**Endogenous:**

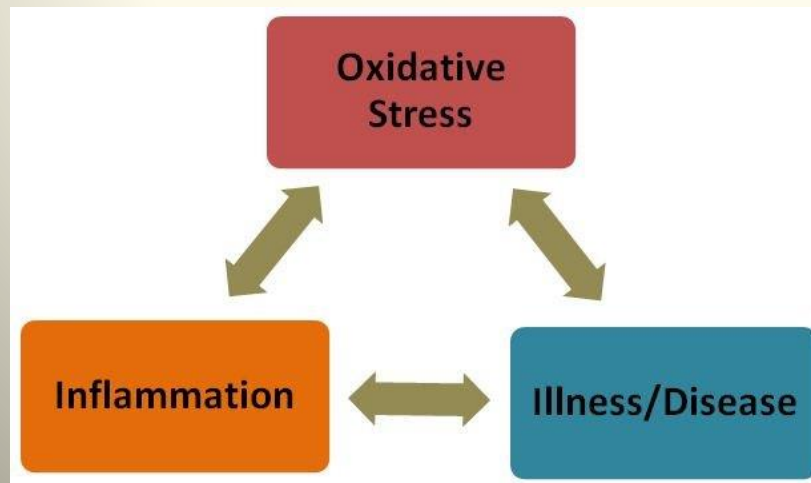
- Bilirubin,
- Bile acids
- Steroids



www.durternick.com 41888628

## ***Inflamacija***

- U procesu fagocitoze do 20 puta je povećana potrošnja kiseonika a posledica može biti stvaranje ROS
- Povećana sinteza vodonik peroksida
- Povećana potrošnja glukoze
- Neselektivno djelovanje ROS na pokretače inflamatornog odgovora i na okolna tkiva
- posredstvom enzima ksantin oksidaze i NADPH oksidaze, u toku fagocitoze dolazi od strane neutrofila do produkcije prekomjerne količine kiseonikovih radikala- 16 puta više nego u „mirnim" neutrofilima



## ***Metali sa promjenjivom valencom***

- u reakciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa metalima koji imaju promjenjivu valencu nastaje jedan od najpotentnijih radikala  $\text{HO}^\circ$ -Fenton reakcija
- Metali sa promjenjivom valencom: Fe, Cu, Mn...
- Toksični metali sa promjenjivom valencom kao što je arsen mogu direktno da dovedu do stvaranja SR
- Vitamin C povećava bioraspoloživost Fe i tako povećava mogućnost da u Fenton reakcijama sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  daje  $\text{HO}^\circ$

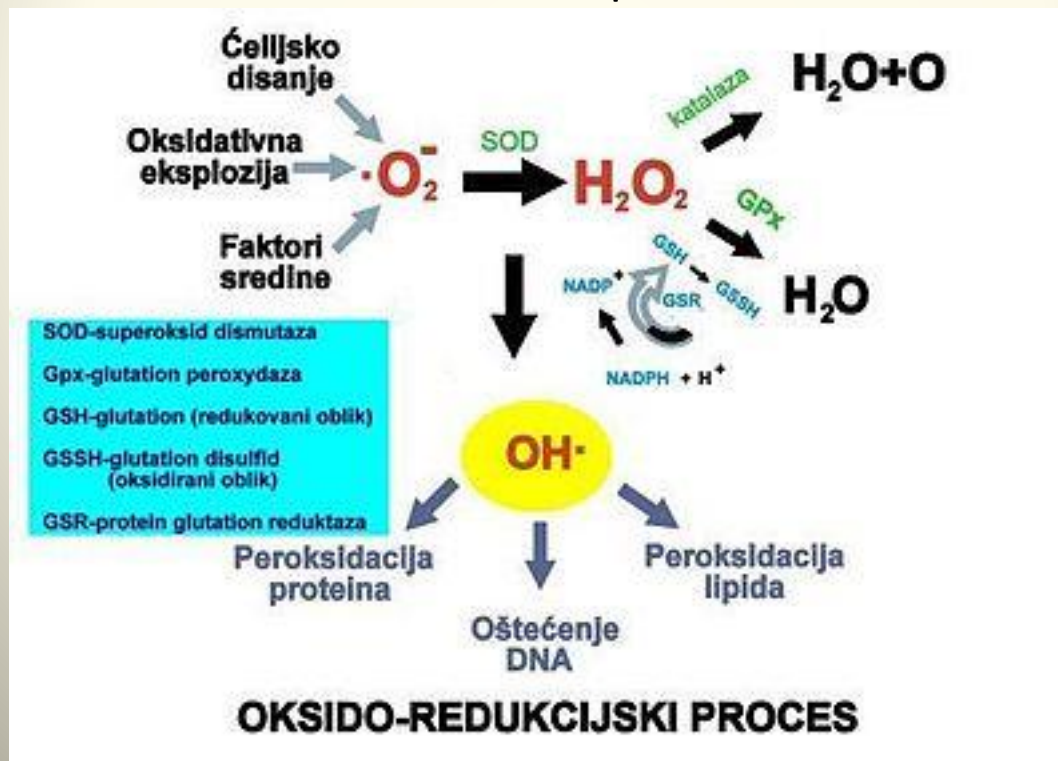


# Bolesti prouzrokovani SLOBODNIM RADIKALIMA

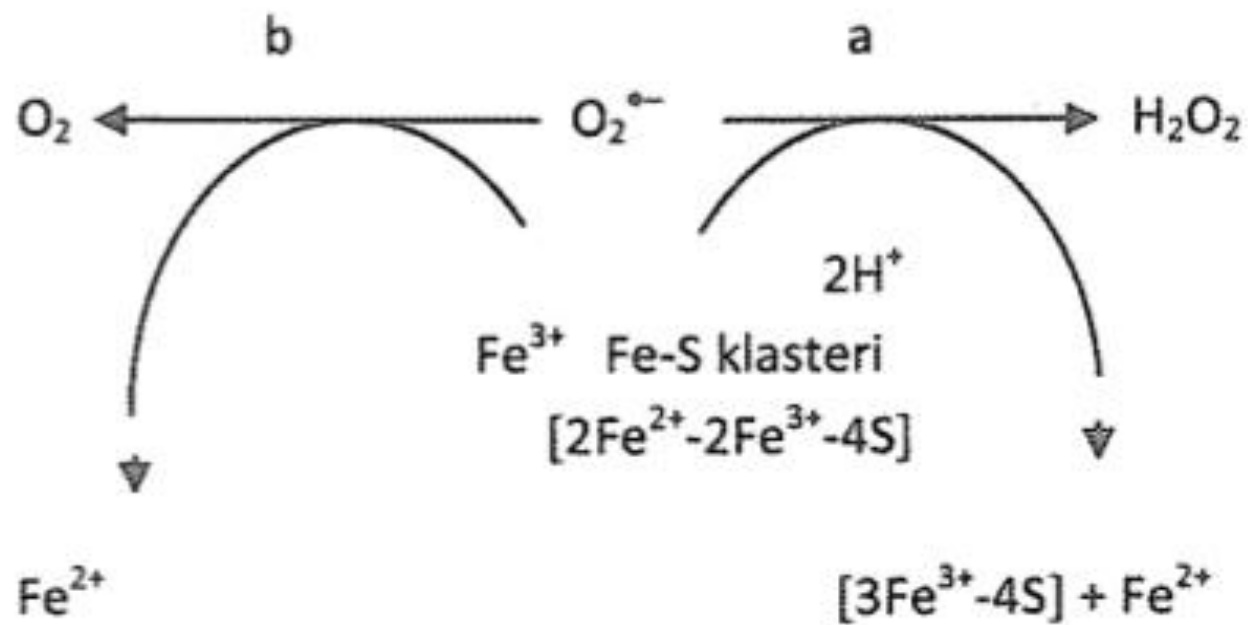


# Najznačajnije reaktivne vrste

- **Reaktivne kiseonične vrste**
- Od brojnih ROS koji nastaju tokom oksidativnog procesa u aerobnim organizmima najznačajniji su superoksil anjon radikal,  $O_2^{\cdot-}$ , vodonik peroksid,  $H_2O_2$ , hidroksil radikal,  $HO^{\cdot}$ , peroksil,  $ROO^{\cdot}$ , hidroperoksil,  $HOO^{\cdot}$ , i dr



- ***Superoksil anjon radikal-O<sub>2</sub><sup>o-</sup>***
- Nastaje jednoelektronskom redukcijom molekularnog kiseonika
- Slaba je baza i u vodenoj sredini je u hidratisanom obliku; nekada može da se ponaša kao elektron donor
- Ne spada u agresivne SR i ne može otpočeti lančanu reakciju
- Metabolički put u mnogome zavisi od pH sredien u kojoj se nalazi, odnosno ovaj molekul može krenuti u pravcu redukcije ili oksidacije
- Ima oksidantno i antioksidantno dejstvo
- U aprotičnoj sredini(niska koncentracija H<sup>+</sup>) favorizovan je put redukcije, do vodonik peroksida
- U protičnoj sredini(visoka koncentracija H<sup>+</sup>) favorizovan je put oksidacije do O<sub>2</sub>



**Slika 3.** Metabolički putevi superoksidnog anjona

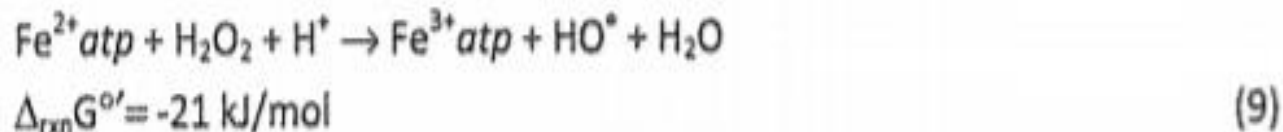
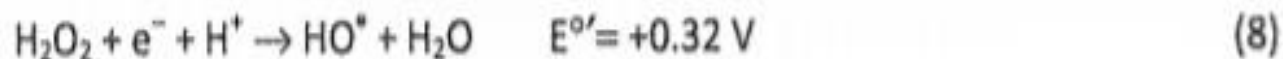
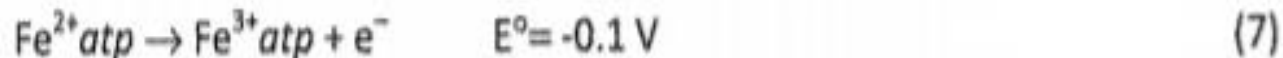
- **Vodonik peroksid –H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**
- Nastaje autooksidacijom O<sub>2</sub><sup>°-</sup>
- Reakcija može teći enzimskim i neenzimskim putem
- U prisustvu superoksid dimutaze reakcija autooksidacije pri pH 7.4 teče 4 puta brže od neenzimske reakcije
- Vodonik peroksid spada u stabilne ROS neradikalnog tipa jer nema nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali
- Veoma lako prolazi kroz ćelijske membrane
- Može da se dosegne daleko od mjesta svog generisanja- prostorna progresija
- Balans vodonik peroksida u organizmu reguliše se kontinuiranim stvaranjem i razgradnjom ovog molekula dejstvom katalaza, peroksidazom i glutation peroksidazom



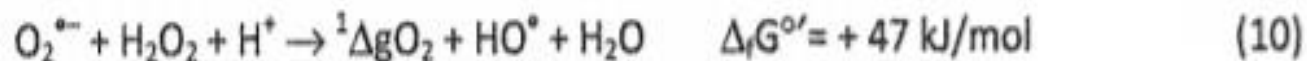
- ***Hidroksil radikal -HO°***
- Najpotentniji ROS , izuzetno je kratkoživeći što znači da je vrlo reaktivan
- Visoka elektrofilnost i visoka termohemijska reaktivnost
- Veoma potentan u reakcijama sa DNK molekulom- stupa u reakciju sa purinskim i pirimidinskim bazama
- guanin- 8-hidroksiguaninski radikal-**povezan sa nastankom kancera**
- In vivo i in vitro se stvara u respiratornom lancu troelektronskom redukcijom O<sub>2</sub>
- Stvara se i u reakciji vodonik peroksida sa metalima promjenjive valence- Fenton reakcija i u neznatnoj količini u Haber-Weiss reakciji



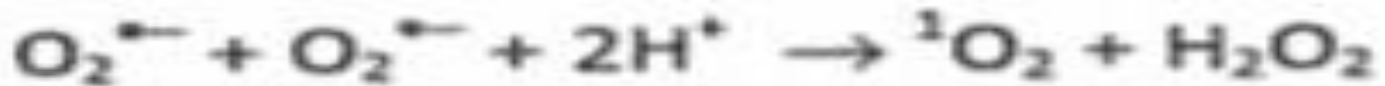
*Fenton* reakcija:



*Haber-Weiss* reakcija:



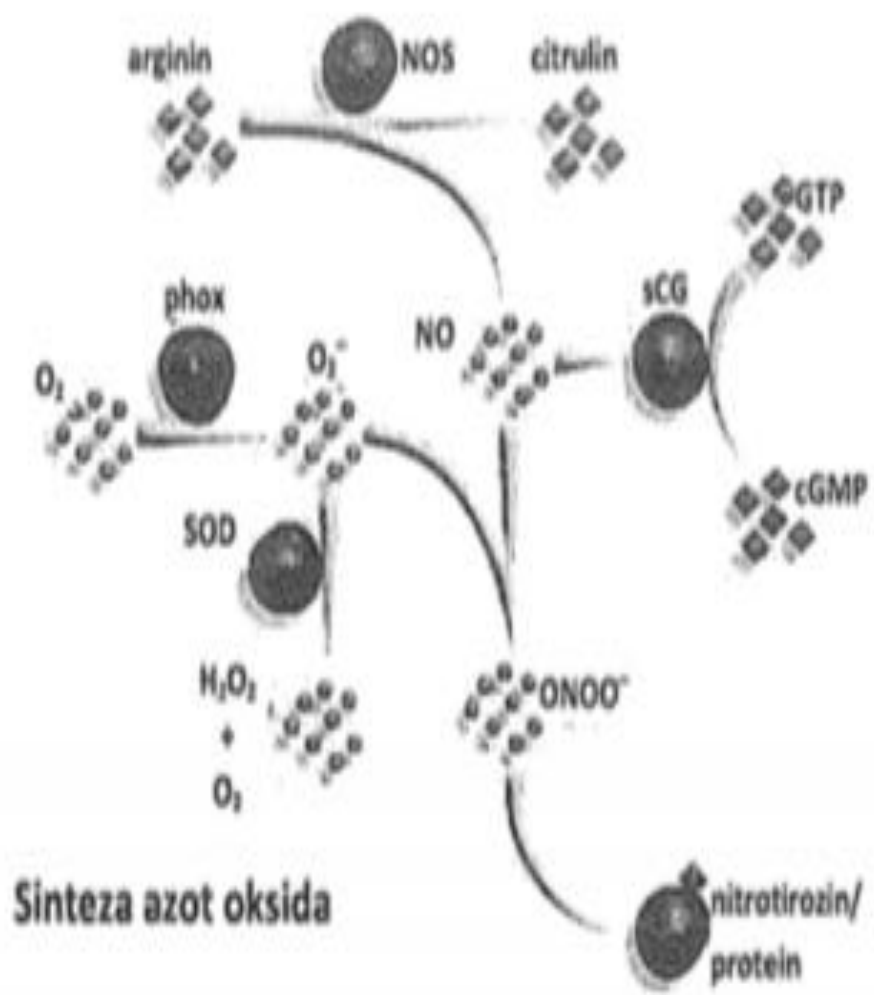
- **„Singelt“ kiseonik- $^1O_2$**
- ROS se mogu generisati ne samo prevođenjem elektrona već i dovođenjem određene količine energije
- Tako nastaje singlet kiseonik  $^1O_2$
- U suštini ovo nije radikal ali posjeduje veći oksidacioni potencijal od osnovnog stanja
- Može nastati u koži pod patološkim dejstvom UV zraka, jonizujućeg zračenja, vještačkog zračenja
- Njihovu sintezu potpomažu fotoosjetljive supstance-hloramfenikol, sulfonamidi..





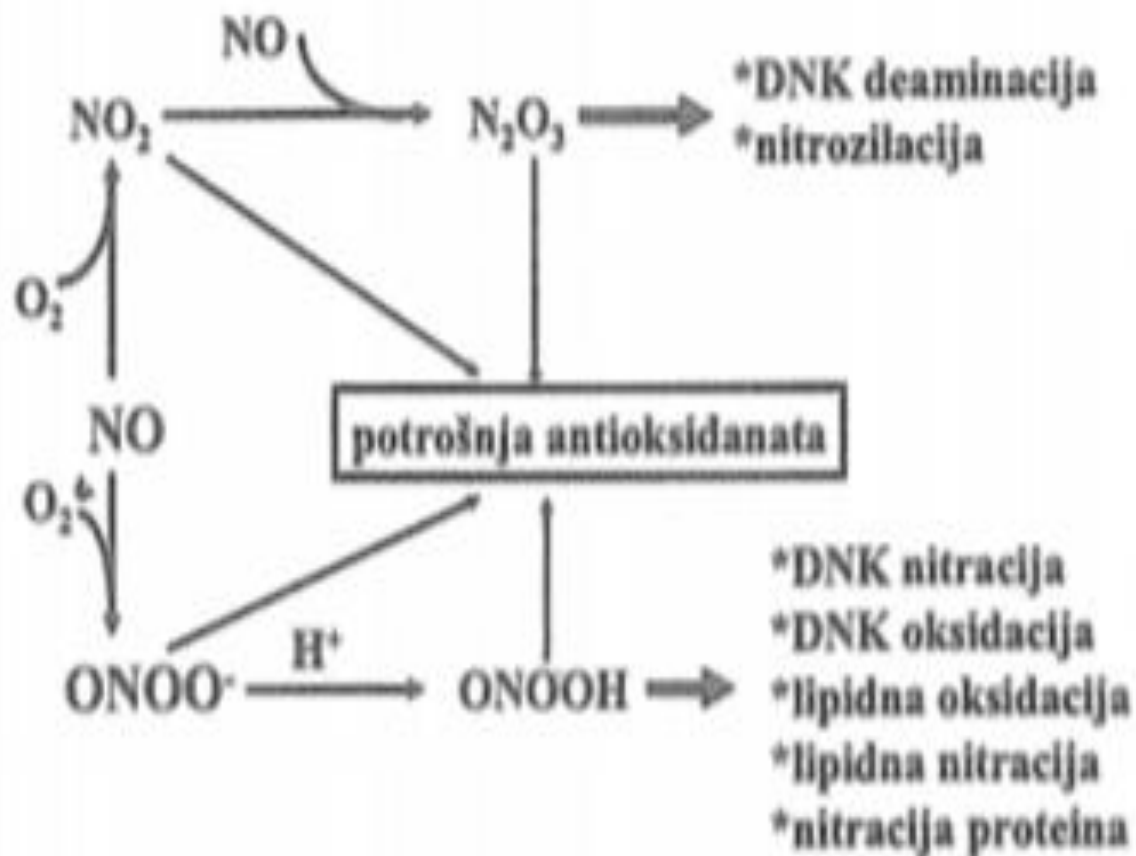
## ***Reaktivne azotove forme***

- ***Azot monoksid-NO***
- Endotel relaksirajući agens, uloga u upalnim procesima, trombozi, imunom odgovoru, neurotransmitterska uloga
- Sinteza iz L-arginina i nastajanje NO i citrulina
- Kranji produkti razgradnje NO su nitrati i nitriti koji se određuju u eksperimentalnim svrhama praćenja količine NO
- Kontroliraju tonus krvnih sudova, smanjuju adheziju i agregaciju trombocita, reguliraju tonus crijeva i poboljšavaju resorpciju Ca<sup>+</sup>, reguliraju tonus mišića, bitan za akt pamćenja, reguliraju glad, bol, san
- Pod određenim uslovima može biti dio patofizioloških događaja
- Redoks stanja bitna za efekte



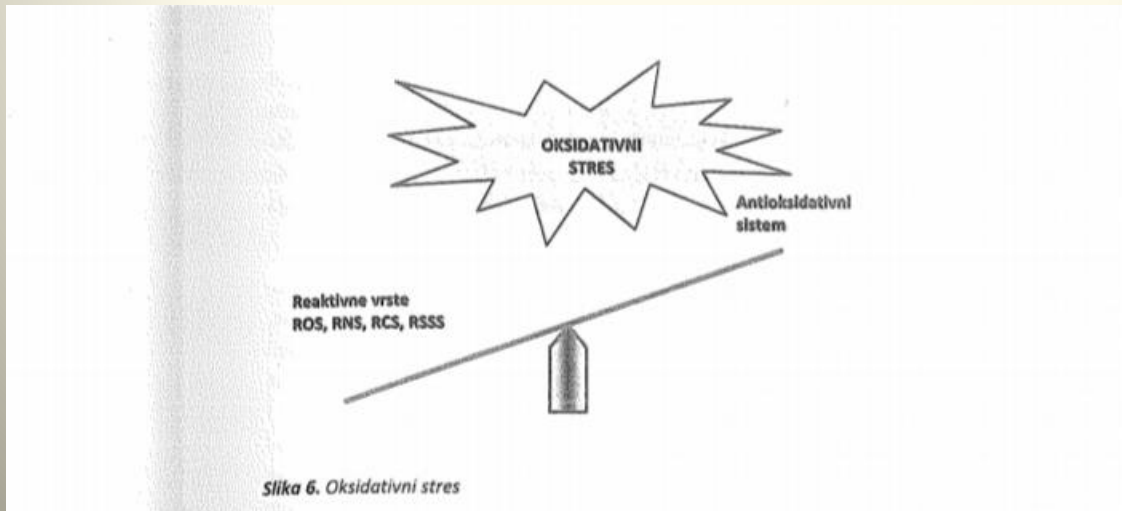
Sinteza azot oksida

- Zaštitna svojstva pokazuju  $\text{NO}^+$  i  $\text{NO}^-$  za razliku od  $\text{NO}^\circ$
- Metali sa promjenjivom valencom su ciljna mjesta vezivanja  $\text{NO}^\circ$  pri čemu nastaju NO-metil kompleksi
- Veoma lako i spontano reaguje i sa  $\text{HO}^\circ$
  
- ***Peroksinitratni anjon- ONOOH***
- Visoko reaktivno jedinjenje neradikalskog tipa
- Efikasan oksidans bioloških tiolnih jedinjenja
- Reakcije uglavnom Fenton tipa
- Započinje procese lipidne peroksidacije i na taj način narušava integritet membrane ćelije
- Oksidiše baze u molekulu DNK
- Djelovanjem na DNK može dovesti do apoptoze

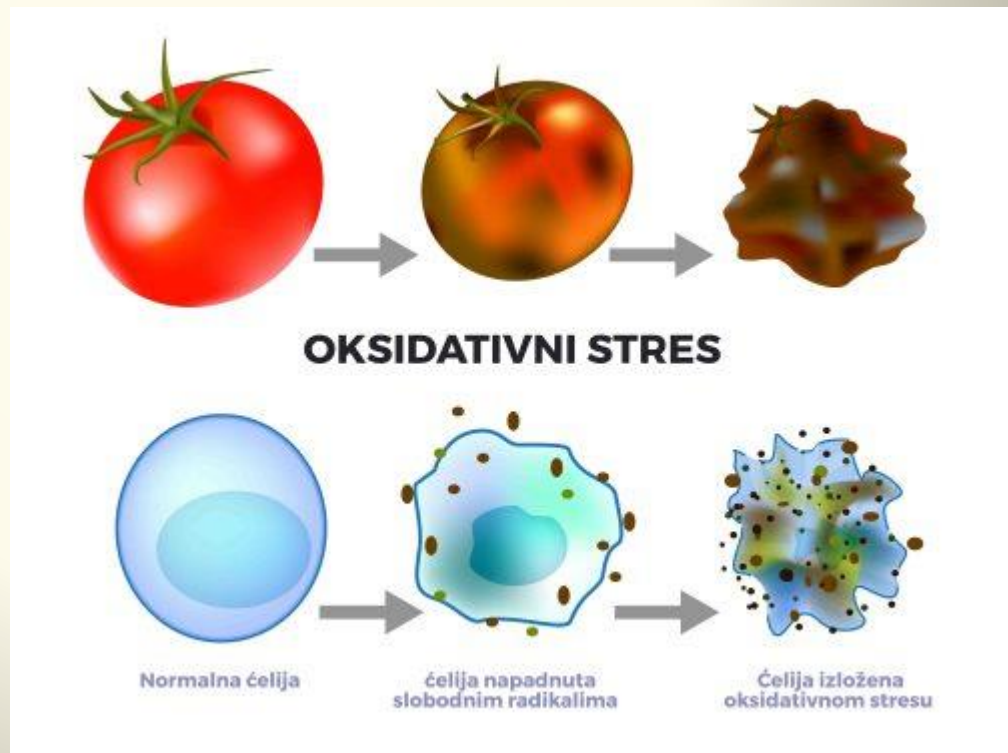


# Oksidativni stres

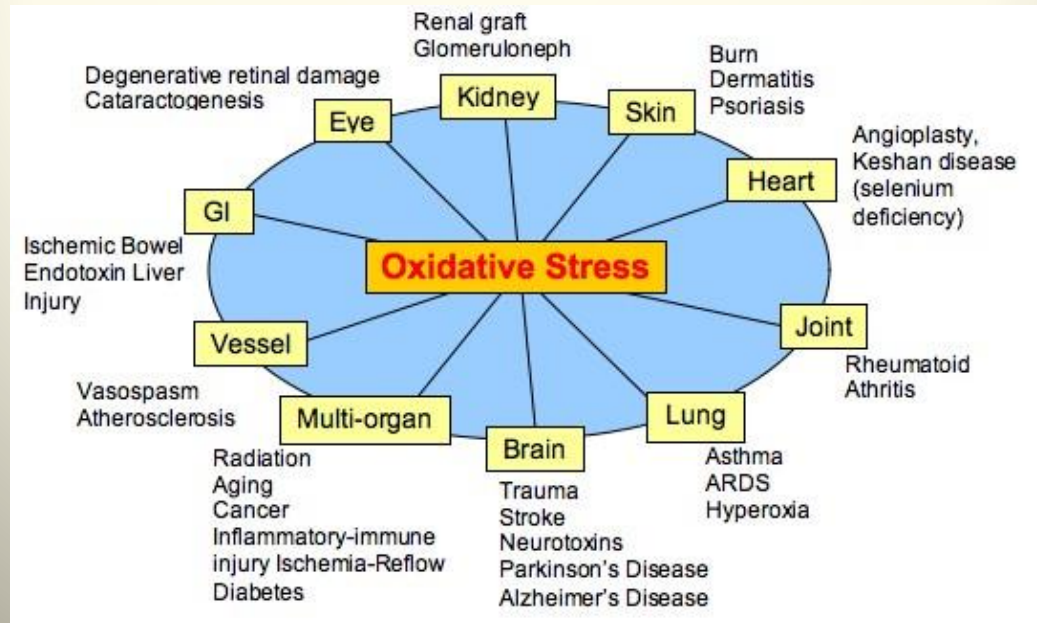
- Kada se tokom prekomjernog stvaranja ili nedovoljnog uklanjanja SR/RS naruši redoks homeostaza ćelije nastaje oksidativni stres
- Koji će se tip oksidativnog stresa razviti zavisi od toga koji molekul djeluje na ćeliju
- Kiseonični radikali dovode do oksidativnog azota i do nitrozovanog stresa ćelije
- Sa aspekta patofiziologije bitno je poznavati kvantifikaciju OS i NS



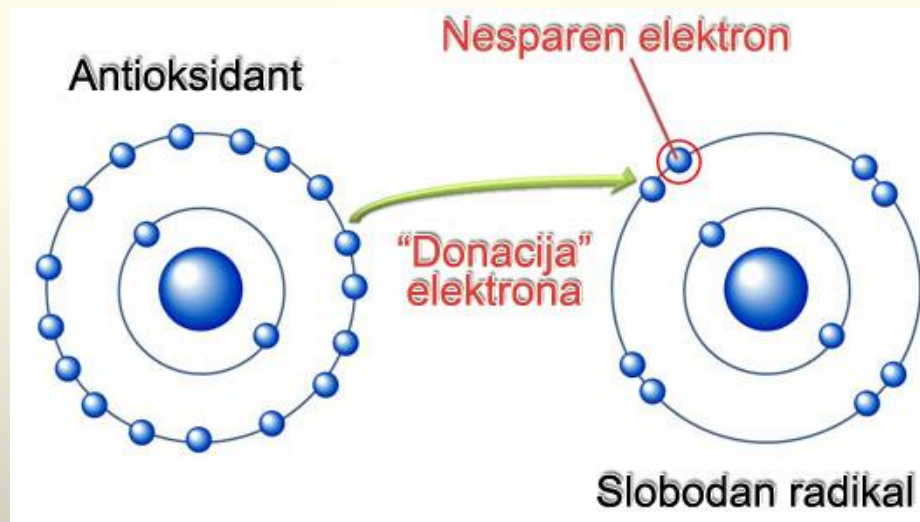
- Još uvijek se ne može potvrditi da li je oštećenje ćelije SR metabolički problem, normalan fiziološki proces, genetski poremećaj, posledica promjene homeostaze ili pak sve zajedno!
- Jednom pokrenut lanac SR ima osobinu vremenskog i prostornog širenja uz pojačanje efekta
- Sekundarni SR



- **Antioksidativna zaštita**
- Niz mehanizama usmjeren protiv štetnog djelovanja RS
- Prevencija stvaranja RS/SR, uklanjanje, reparacija nastalih ćelijskih oštećenja
- Podrazumijeva dejstvo enzimskog i neenzimskog mehanizma
- Enzimi AOS: superoksidna dimutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza-uklanjaju SR tako što utiču na njihovo metabolisanje
- Druga grupa enzima učestvuje u reparaciji već stvorenih ćelijskih defekata



- Neenzimski dio AOS: antioksidansi kao što su vitamin C i E, glutation, urea
- Stupaju u hemijske reakcije sa SR
- Proizvod reakcija su stabilne radikalske forme antioksidanasa, AO°
- SR predaju elektron AO grupi i gube karakter SR-prekidanje lanca
- Proteini koji vezuju metale sa promjenjivom valencom-apoferitin, feritin, ceruloplazmin
- Njihova količina se povećava za vrijeme OS/NS





- Da bi se onemogućilo djelovanje SR neophodno je da AO budu prisutni u dovoljnoj mjeri na mjestu generisanja SR
- Lipofilni AO su važni u zaštiti lipidnih membrana
- Hidrofilni AO sprečavaju nastanak OS/NS u vodenom dijelu ćelije
- Kada su mehanizmi antioksidativne zaštite nedovoljno jaki da preveniraju ili repariraju oštećenja nastala kao posledica djelovanja SR nastaje OS/NS
- Promjena ćelijske permeabilnosti, signalnih sistema, ekspresije gena, replikacije proteina...



# Zaključak

- Slobodni radikali ponašaju se kao oksidansi u organizmu
- U slučaju njihovog prekomjernog stvaranja ili nedovoljnog uklanjanja dolazi do oštećenja svih biomolekula u organizmu
- Mjesto stvaranja SR može biti bilo gdje
- OS-ROS/NS/RNS
- SR pri niskim koncentracijama imaju fiziološku a pri visokim patološku funkciju
- Diabetes mellitus, HIV infekcije, autoimune bolesti, neurodegenerativne bolesti, koronarne, maligne, plućne bolesti,
- Akumulacija oksidativnih oštećenja biomolekula smatra se jednim od osnovnih faktora starenja!!!

