

METABOLIČKA AKTIVNOST JETRE

Jetra ima centralnu ulogu u metabolizmu. U njoj se odvijaju mnogi procesi biosinteze i razgradnje molekula. Takođe, jetra uklanja potencijalno toksične molekule, bilo da su oni nastali kao krajnji proizvodi metabolizma (npr NH_4^+), ili su uneti u organizam (npr etanol, ksenobiotici).

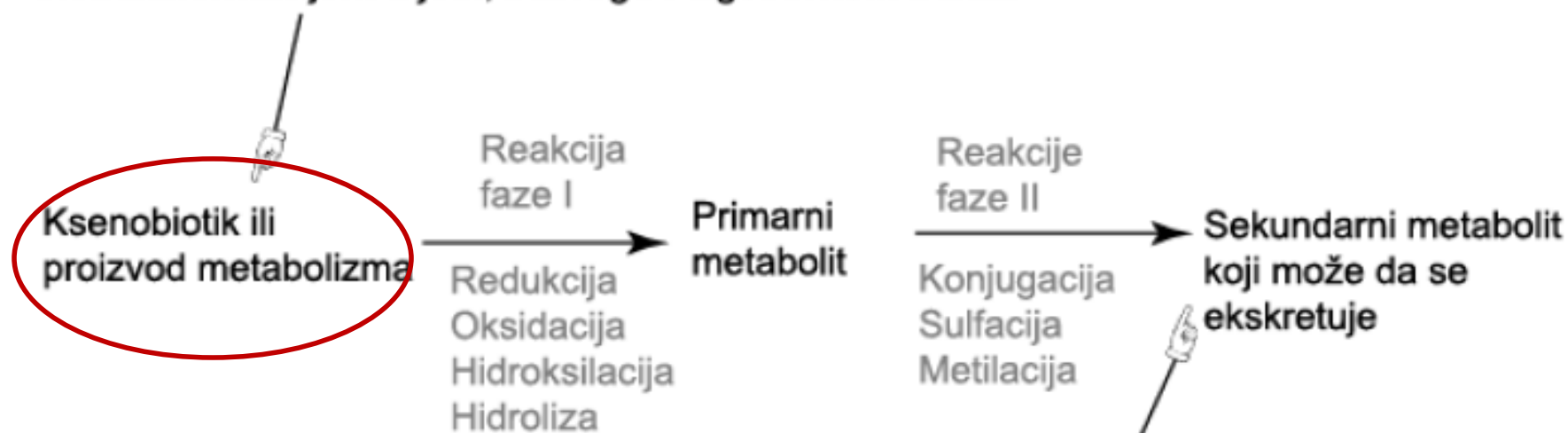
Detoksikacija u hemijskom smislu najčešće podrazumeva transformaciju lipofilnih molekula u hidrofilne molekule, koji se mogu izlučiti iz organizma. Transformacija se odigrava u dve faze:

Faza I- oksidacija, hidroksilacija ili hidroliza pod dejstvom enzima. U ovoj fazi nastaju hemijske grupe koje su supstrat za fazu II

Faza II- konjugacija (sulfacija, metilacija). U ovoj fazi se molekul spaja sa nekim metabolitom, najčešće glukuronskom kiselinom, glicinom, cisteinom, glutaminom, glutationom i sulfatom.

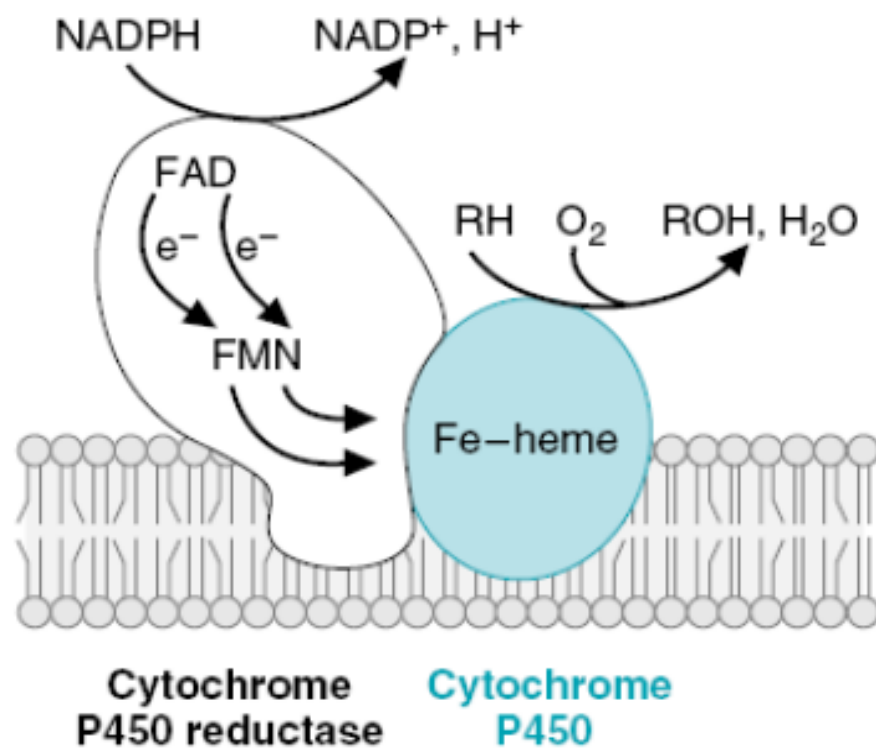
Na ovaj način jetra inaktivira i sopstvene proizvode metabolizma, pri čemu za hidroksilaciju i konjugaciju koristi molekule koji su takođe nastali u metaboličkim procesima u samoj jetri.

Mnogi ksenobiotici sadrže aromatičnu ili hererocikličnu prstenastu strukturu, koja ne može ni da se razradi ni da se ponovo iskoristi u biosintetskim procesima. Ove strukture su hidrofobne i zadržavaju se u masnom tkivu, sve dok se ne uklone biotransformacijom u jetri, bubregu i digestivnom traktu.



U nekim slučajevima, molekuli prolaskom kroz fazu I i fazu II mogu da budu transformisani u toksične ili čak kancerogene molekule.

Citohrom P450



O_2 se vezuje za P_{450} Fe-hem u aktivnom centru i aktivira se u reaktivnu formu prihvatanjem elektrona. Elektroni se predaju sa citohrom P_{450} reduktaze, koja sadrži FAD, FMN ili Fe-S centar koji olakšavaju prenos pojedinačnog elektrona sa NADPH na O_2 .

Enzimi P450 koji su uključeni u steroidogenezu imaju nešto drugačiju strukturu. Za CYP2E1, RH je etanol (CH_3CH_2OH), a ROH je acetaldehid (CH_3COH).

Etanol se kao mali, istovremeno i hidrofilan i lipofilan molekul, lako apsorbuje iz digestivnog trakta prostom difuzijom. Najveći deo (preko 95%) resorbovanog etanola ulazi u krv od čega se 85-98% metabolički razgrađuje u jetri.

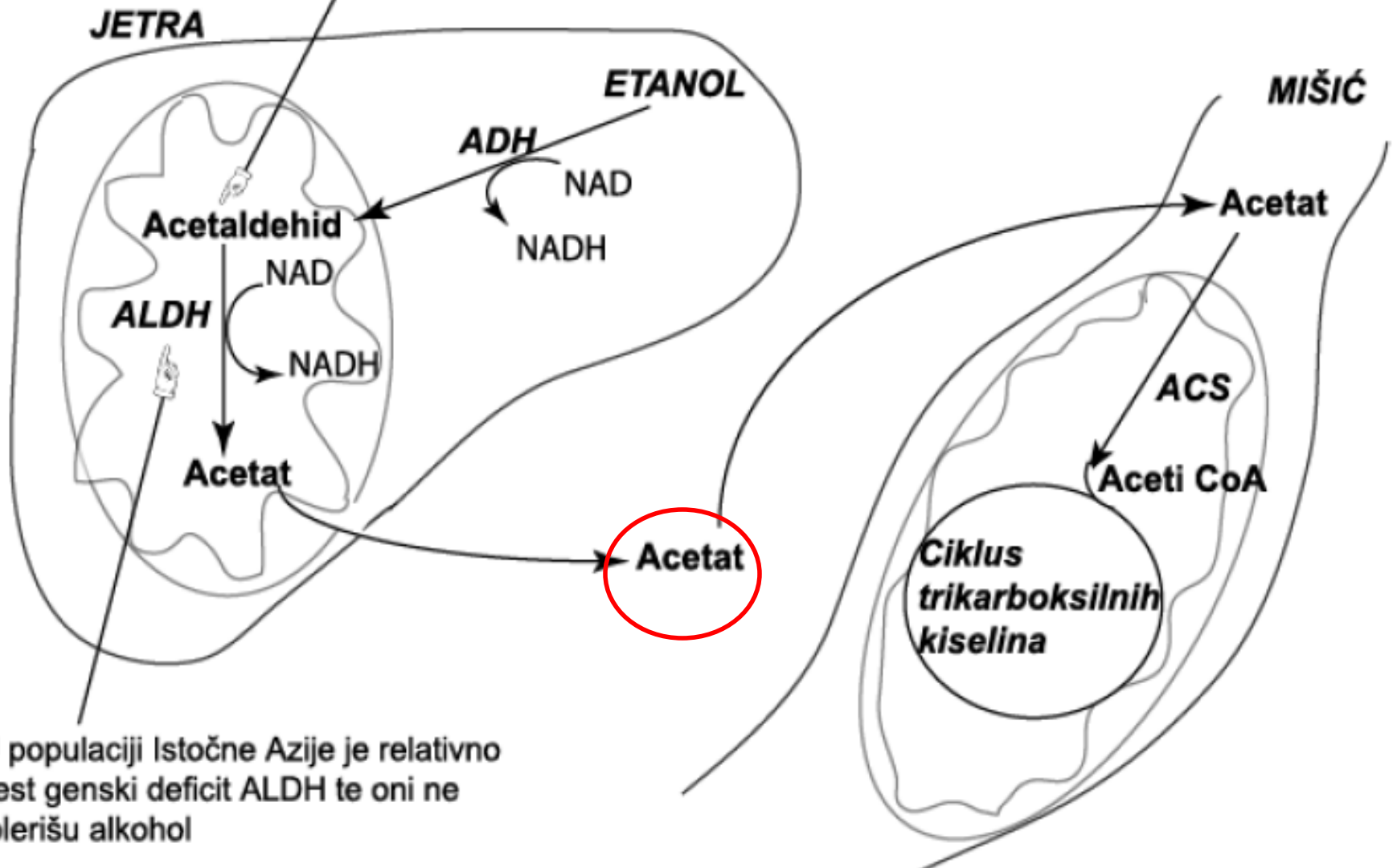
Glavni metabolički put razgradnje etanola je njegova oksidacija u **acetaldehid** (*citosolna alkohol dehidrogenaza, ADH*). Nastali acetaldehid se dalje oksiduje u acetat (**80% mitohondrijalna acetaldehid dehidrogenaza ALDH**). Jedan deo acetata se u jetri već aktivira u acetil CoA mada najveći deo acetata odlazi u krv odakle ga uglavnom preuzimaju skeletni mišići. U njima se acetat aktivira u acetil CoA (*mitohondrijalni izoenzim acetil CoA sintetaze, ACS*) i dalje oksiduje u ciklusu trikarboksilnih kiselina.

I u reakciji koju katalizuje *alkohol dehidrogenaza* i *acetaldehid dehidrogenaza*, nastaje NADH koji se iskorišćava u oksidativnoj fosforilaciji za generisanje ATP-a.

Manji deo etanola (10-20%) se u jetri oksiduje u mikrozomalnom sistemu jetre koji obuhvata citohrom P450. Ovaj enzimski sistem ima visok K_m za etanol zbog čega se etanol metaboliše ovim putem tek kada je njegova koncentracija visoka.

Akutni efekti unosa veće količine alkohola nastaju usled generisanja NADH zbog čega se u jetri povećava odnos NADH/NAD⁺. To dovodi do smanjenja oksidacije masnih kiselina i povećane sinteze triacilglicerola (masna jetra), povećane sinteze ketonskih tela (ketoacidoza) a može doći i do inhibicije glukoneogeneze (hipoglikemija).

Za neželjene efekte koji se javljaju po konzumiranju etanola je odgovorana acetaldehid, intermedijat metabolizma etanola koji iz jetre može da uđe u krv.



U populaciji Istočne Azije je relativno čest genski deficit ALDH te oni ne tolerišu alkohol

- **Regulacija glikemije**
- **Sinteza i eksport holesterola i TAG**
- **Ciklus sinteze uree**
- **Sinteza ketonskih tela**
- **Biosinteza nukleotida**
- **Sinteza protina plazme**
- **Sinteza glikoproteina i proteoglikana**
- **Pentozofosfatni put**

Jetra ima veoma značajnu ulogu u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina. U njoj se odvijaju svi metabolički procesi, kao i u drugim tkivima, ali i procesi koji se u drugim tkivima ne odigravaju kao što su: defosforilacija glukoze 6-fosfata (*glukoza 6-fosfataza*), sinteza ketonskih tela, sinteza uree, sinteza VLDL, sinteza žučnih kiselina i detoksikacija.

GORIVO ZA JETRU

Za reakcije koje služe za obradu ili inaktivaciju toksina unetih hranom ili nastalih u toku metabolizma, neophodno je prisustvo energije kao i reakcije anabolizma-glukoneogeneza i sinteza masnih kiselina. Zbog toga jetra ima visoke energetske zahteve i potrebu za oko 20% ukupnog telesnog kiseonika.

Primarni oblik koji predstavlja glavni oblik potrebne energije za odvijanje procesa u jetri je ATP, UTP i GTP, NADPH, i acil-CoA tioestri.

Energija koja je potrebna za njihovu sintezu se dobija direktno iz aerobnog metabolizma, Krebsovog ciklusa, ili elektron transportnog lanca i oksidativne fosforilacije.

Po unošenju mešovitog obroka koji sadrži ugljene hidrate, glavno gorivo koje koristi jetra je glukoza, galaktoza i fruktoza.

Ukoliko se unosi etanol, jetra je glavno mesto oksidacije etanola pri čemu nastaje acetat a potom i acetil CoA.

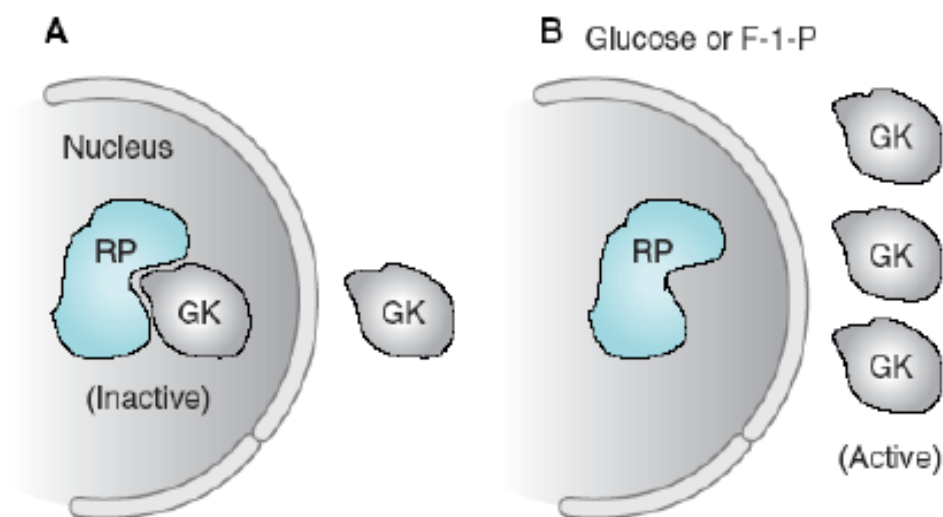
Tokom noćnog gladovanja, masne kiseline su glavno gorivo za jetru. One se oksiduju do CO₂ ili ketonskih tela.

Jetra može da koristi i sve AK, prevodeći ih u glukozu.

Ciklus sinteze uree služi za odstranjivanje amonijaka.

Metabolizam Ugljenih hidrata u jetri

Glukoza kao gorivo



Regulacija glukokinaze pomoću regulatornog proteina (RP).

RP je lokalizovan u jedru i u odsustvu glukoze ili prisustvu fruktozo 6-fosfata, veći deo glukokinaze se translocira u jedro i vezuje RP. Ovo dovodi do formiranja inaktivne forme glukokinaze.

Kada dođe do porasta koncentracije glukoze ili fruktozo-1-fosfata, glukokinaza se odvaja od RP, translocira se u citoplazmu i aktivno prevodi glukozu u glukozo 6-fosfat.

Metabolizam amino kiselina

1. Metabolički putevi za oksidaciju svih AK do CO₂. Mogu biti prevedene u ketonska tela ili u glukozu (glukoneogeneza).
2. Ciklus sinteze uree.
3. Posle mešovitog visoko proisnkog obroka, epitelne ćelije GIT-a koriste aspartat, glutamat i gčlutamin iz hrane kao gorivo (tokom gladovanja koriste glutamin iz cirkulacije, kao glavno gorivo). Tako, AK unete hranom ne dospevaju u sistemsku cirkulaciju. N₂ nastao u metabolizmu u GIT-u dolazi do jetre kao citrulin ili amonijum jon putem v. Portae.

Metabolizam amino kiselina

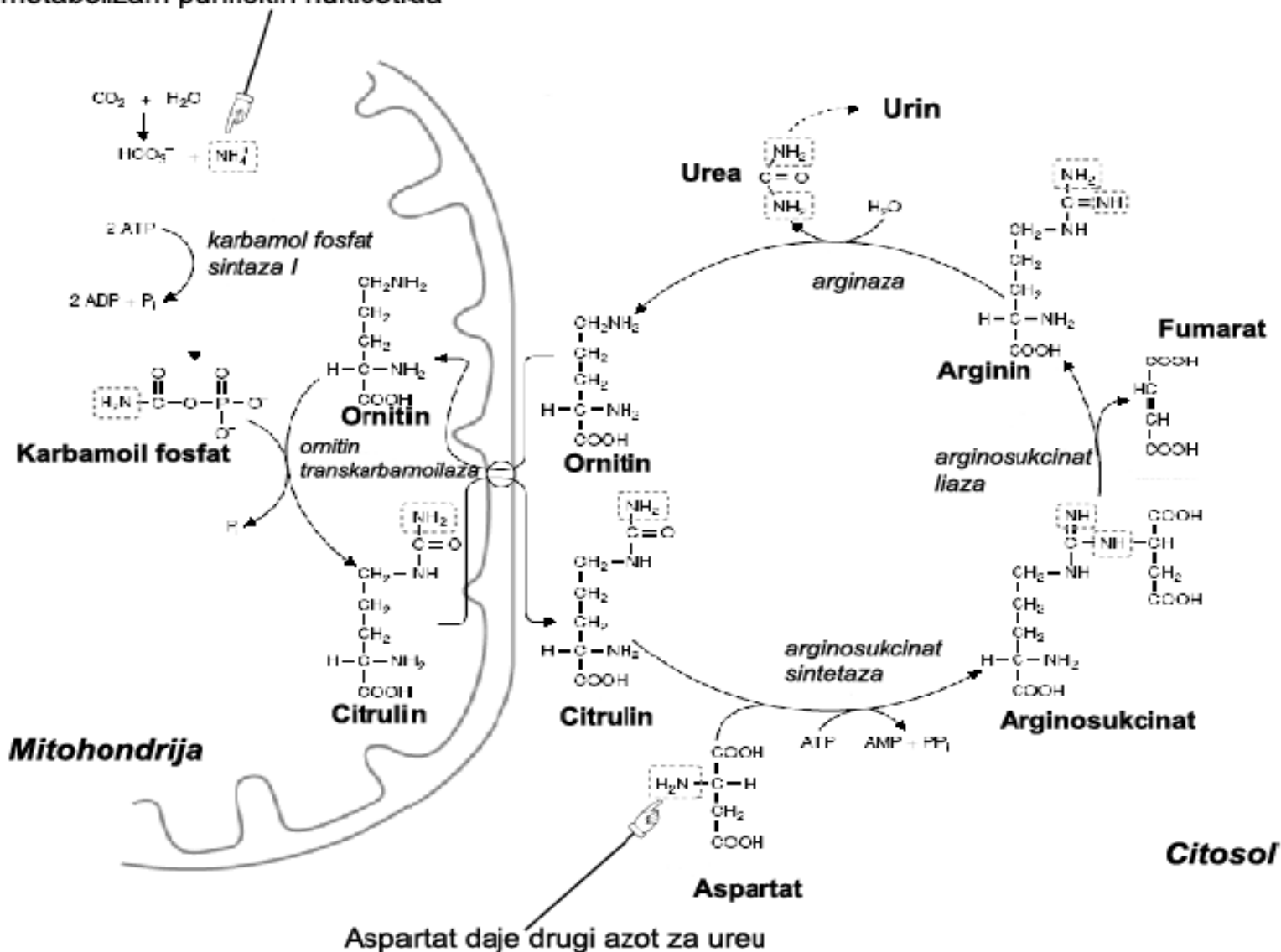
4. Razgranate AK (valin, leucin, i izoleucin) se malo koriste u jetri, za razliku od drugih tkiva koja poseduju psecifične transaminaze.
5. Azot iz mnogih tkiva dospeva u jetru u obliku alanina (skeletni mišići, bubreg, mukoza GIT-a) ili glutamina (skeletni mišići, pluća, nervno tkivo) ili serina (bubreg)
6. Koristi AK za sintezu proteina.

Posebno je značajna njena **uloga u regulisanju glikemije** u periodu gladovanja što je omogućeno razgradnjom depoa glikogena i glukoneogenezom za koju su najčešći supstrati laktat i alanin iz mišića, glicerol iz masnog tkiva i glukogene amino kiseline iz hrane. Sa druge strane, u periodu sitosti, glukoza se unosi u hepatocite i čuva u vidu glikogena čime se sprečava nastanak hiperglikemije.

Takođe, **jetra sintetiše ketonska tela**, veoma značajan izvor energije pri dugotrajnom gladovanju, koja mogu da koriste sva ekstrahepatična tkiva pa i mozak, ali ne i sama jetra. Ona ne može da koristi ketonska tela jer sadrži jako malo enzima *transferaze*, koja je potrebna za aktivaciju acetoacetata (oksidacija ketonskih tela).

Svoje sopstvene energetske potrebe jetra zadovoljava na različite načine: oksidacijom glukoze, masnih kiselina ili acetil CoA.

NH_4^+ daje jedan azot za ureu. NH_4^+ može da potiče od glutamata ili iz "drugih izvora" kao što su reakcije deaminacije drugih amino kiselina ili dejstvo bakterijske flore u GIT-u, ili metabolizam purinskih nukleotida





METABOLIZAM ETANOLA

- **Etanol** predstavlja gorivo i najvećim delom se metabolički obrađuje u jetri, i to u acetat pri čemu nastaje NADH.
- Osnovni put njegove metaboličke obrade je njegova oksidacija u acetaldehid aktivnošću **citosolne alkohol dehidrogenaze**
- Nastali acetaldehid se dalje oksiduje **mitohondrijalnom acetaldehid dehidrogenazom u acetat.**
- Acetaldehid koji je toksičan takođe može da uđe u cirkulaciju.
- NADH koji nastaje u ovoj reakciji se koristi za generisanje ATP-a u oksidativnoj fosforilaciji.
- Najveći deo acetata ulazi u krv i biva preuzet u skeletne mišiće i druga tkiva gde se aktivira u acetil CoA koji dalje može da se oksiduje u ciklusu trikarboksilnih kiselina.

Približno oko 10 do 20% unetog etanola se oksiduje u mikrozomalom oksidujućem sistemu (**MEOS**), koji obuhvata citohrom **P450** enzime u EPR (posebno **CYP2E1**).

CYP2E1 ima visok Km za etanol i inducibilan je na prisustvo etanola.

Zbog toga se veći deo etanola metaboliše ovim putem pri visokim koncentracijama etanola i povećan je posle hroničnog konzumiranja etanola.

Akutni efekti unošenja alkohola nastaju kao posledica generisanja NADH koji povećava odnos **NADH/NAD** u jetri.

Kao posledica toga, dolazi do inhibicije u oksidaciji masnih kiselina i može doći do ketogeneze.

Povećan odnos **NADH/NAD** takođe može da dovede do laktične acidoze i inhibicije glukoneogeneze.

- Metabolizam etanola može da dovede do alkoholom indukovane bolesti jetre, što obuhvata steatozu jetre (masna jetra), alkoholom indukovani hepatitis i cirozu jetre.
- Glavni toksični proizvodi metabolizma etanola obuhvataju acetaldehid i slobodne radikale.
- Acetaldehid se vezuje za proteine i druga jedinjenja.
- Hidroksietil radikal, koji nastaje u MEOS sistemu kao i drugi radikali koji nastaju tokom inflamacije dovode do ireverzibilnih oštećenja jetre. Mnoga druga tkiva su takođe oštećena etanolom, acetaldehidom ili posledično zbog poremećaja funkcije same jetre.

- Genetski polimorfizam enzima koji su uključeni u metabolizam etanola može da bude odgovoran za individualnu razliku u nastanku ili ispoljavanju alkoholizma kao i razvoju ciroze jetre.

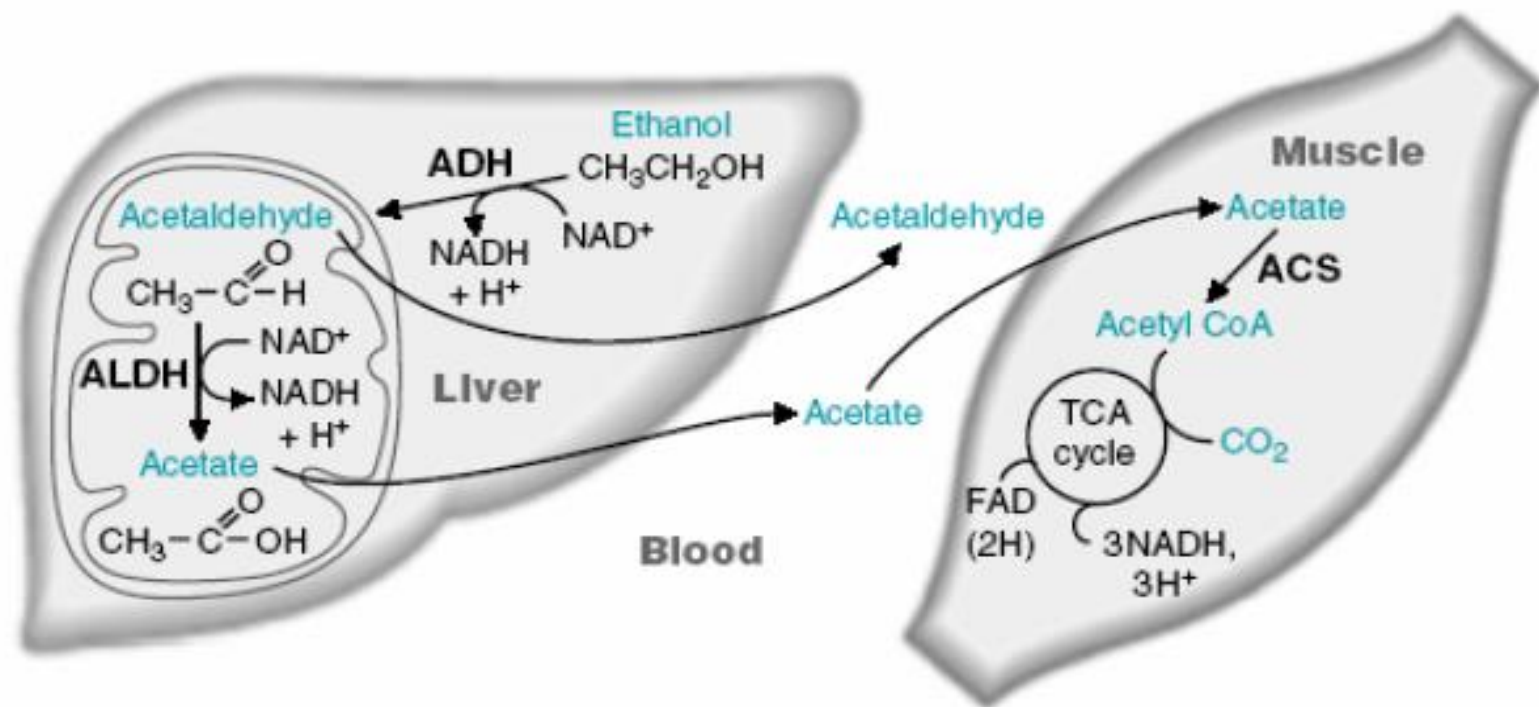
- Svaki enzim koji je uključen u metabolizam etanola (alkohol DH, acetaldehid DH, CYP2E1) postoji u više različitih izoenzimskih oblika.

- Ove varijacije u količini ovih izoenzima utiču na mnoge faktore, kao što je brzina uklanjanja etanola iz krvi, stepen alkoholizma koji se razvija kod pojedinaca i individualna osetljivost na razvoj alkoholne jetre.

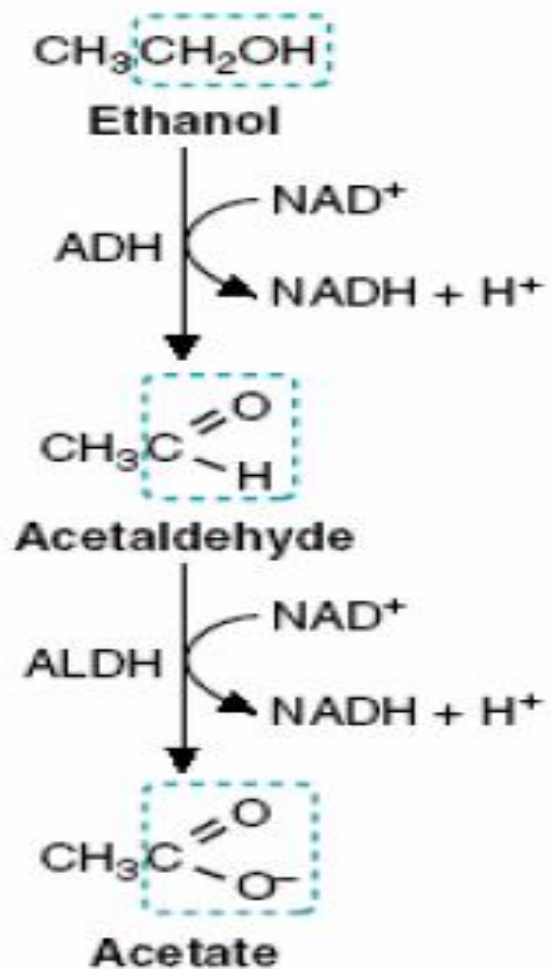
Table 25.1. Isozymes of Medium-Chain-Length Alcohol Dehydrogenases

Class	Gene	Sub-Unit	Tissue Distribution	Properties
I	ADH 1 ADH 2 ADH 3	α β γ	Most abundant in liver and adrenal glands. Much lower levels in kidney, lung, colon, small intestine, eye, ovary, blood vessels. None in brain or heart	K_m of 0.05–4 mM for ethanol. Active only with ethanol. High tissue capacity.
II	ADH 4	π	Primarily liver, lower levels in GI tract	K_m of 34 mM for ethanol.
III	ADH 5	χ	Ubiquitously expressed, but at higher levels in liver. The only isozyme present in germinal cells.	Relatively inactive toward ethanol. Active mainly toward long-chain alcohols, and ω -OH fatty acids.
IV	ADH 7	σ	Present in highest levels in upper GI tract, gingiva and mouth, esophagus, down to the stomach. Not present in liver.	K_m of 28 mM. It is the most active of medium-chain alcohol DH toward retinal.
V	ADH 6	-	May be highest in fetal liver.	Some activity toward ethanol

Glavni put metabolizma etanola i iskorišćavanja acetata u skeletnom mišiću

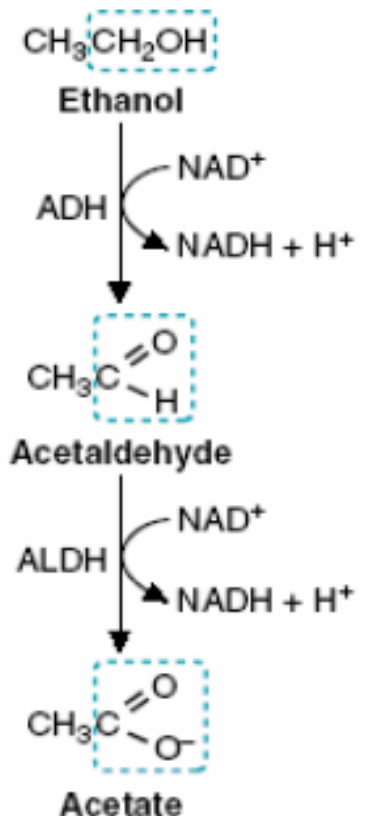


Metabolizam etanola



Alkohol Dehidrogenaza

- **Alkohol dehidrogenaza (ADH)** postoji kao familija izoenzima koji ispoljavaju različitu specifičnost prema dužini lanca supstrata na koji deluje alkohol.
- Etanol je mali molekul koji se nespecifično metabolički obrađuje članovima ADH familije.
- ADH koja ispoljava najveću specifičnost prema etanolu je klasa I ADH. Postoje 3 gena za klasu I ADH, od kojih svaka postoji kao alelna forma (polimorfizam).



• **Klasa I ADH** postoji u velikoj količini u jetri i čini oko 3% svih solubilnih proteina. Ova ADH se uglavnom naziva jetrinom ADH, koja ima nizak K_m za etanol, između 0,05 i 4 mM (visok afinitet). Zbog toga je jetra glavno mesto metaboličke obrade etanola i generisanja toksičnog metabolita, acetaldehida.

• I ako **klasa IV i II** manje učestvuju u metabolizmu etanola, mogu da doprinesu toksičnim efektima.

• Koncentracija etanola može da bude veoma visoka u gornjim partijama GIT-a (npr. pivo čini oko 0,8 M etanola), i acetaldehid koji nastaje aktivnošću **klase IV** enzima (gastrična ADH) može da doprinese riziku za razvoj karcinoma usled alkoholizma.

• **Klasa II ADH** gena se primarno eksprimira u jetri i u nižim partijama GIT-a.

Table 25.1. Isozymes of Medium-Chain-Length Alcohol Dehydrogenases

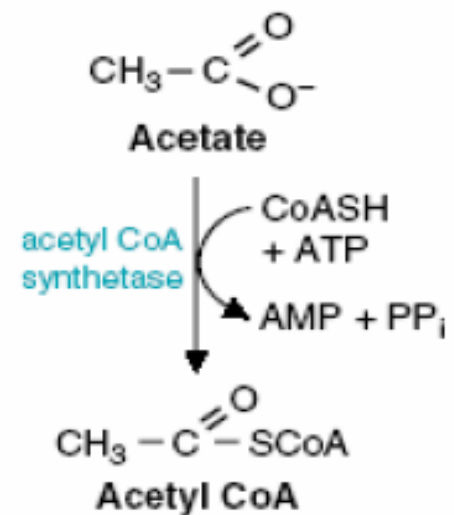
Class	Gene	Sub-Unit	Tissue Distribution	Properties
I	ADH 1 ADH 2 ADH 3	α β γ	Most abundant in liver and adrenal glands. Much lower levels in kidney, lung, colon, small intestine, eye, ovary, blood vessels. None in brain or heart	K_m of 0.05–4 mM for ethanol. Active only with ethanol. High tissue capacity.
II	ADH 4	π	Primarily liver, lower levels in GI tract	K_m of 34 mM for ethanol.
III	ADH 5	χ	Ubiquitously expressed, but at higher levels in liver. The only isozyme present in germinal cells.	Relatively inactive toward ethanol. Active mainly toward long-chain alcohols, and ω -OH fatty acids.
IV	ADH 7	σ	Present in highest levels in upper GI tract, gingiva and mouth, esophagus, down to the stomach. Not present in liver.	K_m of 28 mM. It is the most active of medium-chain alcohol DH toward retinal.
V	ADH 6	-	May be highest in fetal liver.	Some activity toward ethanol

Acetaldehid Dehidrogenaza

- Acetaldehid se oksiduje u acetat pri čemu se generiše NADH, aktivnošću acetaldehid DH .
- Više od 80% oksidacije acetaldehida u humanoj jetri je katalisano mitohondrijalnom ALDH (ALDH2), koja ima visok afinitet prema acetaldehidu i visoko je specifična.
- Pojedinci sa drugačijom alelnom varijantom ALDH2 imaju znatno snižen kapacitet za metabolizmom acetaldehida. Najveći deo preostale oksidacije acetaldehida se dešava u citoplazmi katalisano citosolnom ALDH (ALDH1).
- Dodatno, ALDH deluje na različite organske alkohole, toksine

Sudbina Acetata

- Metabolizam acetata zahteva aktivaciju u acetil- CoA (acetil- CoA sintetaza).
- U jetri, glavna izoforma acetil- CoA sintetaze (ACS I) je citosolni enzim koji generiše acetil- CoA za citosolne metaboličke puteve tj sintezu holesterola i masnih kiselina.
- Acetat koji ulazi u ove puteve se nalazi pod kontrolom insulina ili metabolizma holesterola. Tako, najveći deo acetata ulazi u krv.
- Acetat se preuzima i oksiduje u drugim tkivima, pre svega srcu i skeletnim mišićima koji imaju visoku koncentraciju acetil- CoA sintetaze, izoforma (ACSII).Ovaj enzim je prisutan u mitohondrijalnom matriksu.
- Tako se generiše acetil- CoA koji direktno može da se uključi u ciklus trikarboksilnih kiselina i da se osiduje do CO₂.



ACS I- citosol (jetra)

ACS II- mitohondrije (srce, mišić)

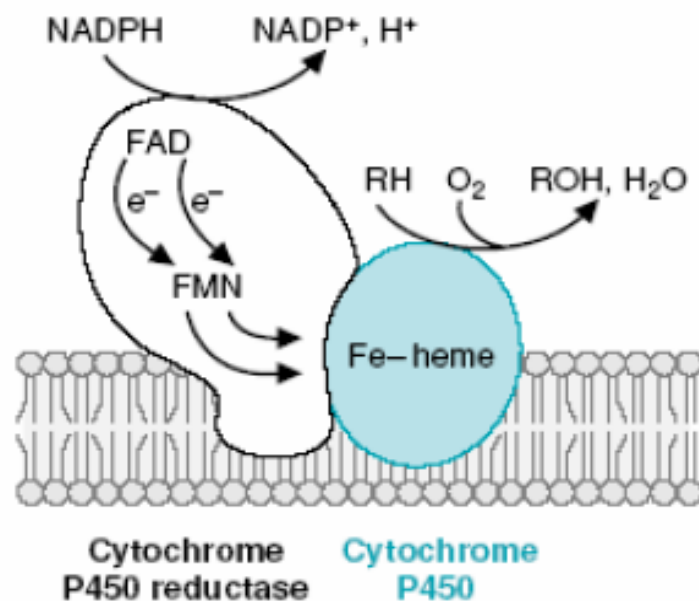
Mikrozomalni Etanol Oksidujući Sistem (MEOS)

Etanol se takođe oksiduje u acetaldehid u jetri aktivnošću MEOS-a, koji čini grupa enzima koji pripadaju familiji citohroma P450.

Etanol i NADPH daju elektrone za reakciju, kojom se O_2 redukuje do $2H_2O$.

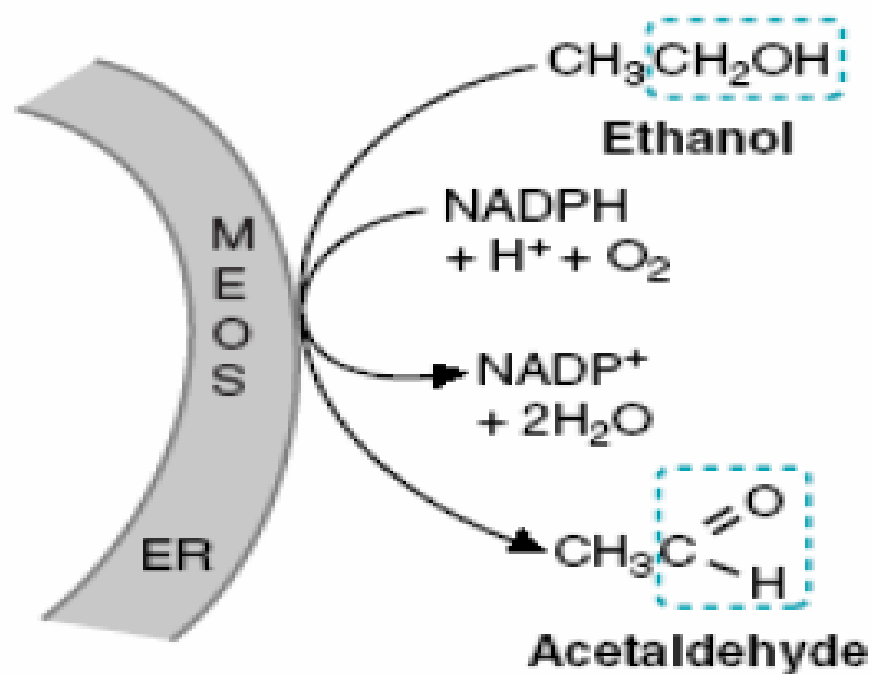
Enzimi citohroma P450 imaju dve glavne katalitičke komponente: reduktazni domen koji je donor elektrona i prenosi sa NADPH (citohrom P450 reduktaza) i citohrom P450.

Citohrom P450 sadrži vezna mesta za O_2 i supstrat (npr etanol) i tu se sama reakcija i odigrava.



Za CYP2E1, RH je etanol (CH_3CH_2OH) a ROH je acetaldehid (CH_3COH).

Mikrozomalni Etanol Oksidujući Sistem (MEOS)



1. CYP2E1

MEOS je deo superfamilije citohroma P450, i svi enzimi ove superfamilije katalizuju slične reakcije oksidacije. Unutar ove superfamilije, najmanje 10 različitih gena je prisutno kod sisara. Više od 100 različitih izoenzima za citohrom P450 postoji unutar ovih 10 različitih familija gena. Izoenzimi koji imaju najveći afinitet prema etanolu se zovu CYP2E1. Međutim, postoji veliko preklapanje u specifičnosti tako da se etanol oksiduje različitim citohrom P450 izoenzimima.

CYP2E1 ima veće K_m prema etanolu nego klasa I ADH (11 mM [51 mg/dL] u odnosu na 0.05–4 mM [0.23 to 18.4 mg/dL]).

Zbog toga se veći deo etanola metabolički obrađuje pomoću CYP2E1 pri visokom unosu etanola, nego pri nižem unosu etanola.

2. INDUKCIJA ENZIMA P450

Enzimi P450 su inducibilni i svojim specifičnim supstratom ali i supstratom nekog drugog enzima citohroma P450.

Hronično konzumiranje etanola povećava nivo CYP2E1 u jetri oko 5-10 puta. Takođe, dolazi i do porasta oko 2-4 puta nekih drugih citohroma P450 iz iste familije, različitih subfamilija kao i različitih genskih familija.

EPR proliferiše sa uopštenim povećanjem sadržaja mikrozomalnih enzima pa i onih koji nisu direktno uključeni u metabolizam etanola.

Povećanje CYP2E1 sa konzumiranjem etanola se dešava na nivou regulacija transkripcije, post-transkripcije kao i post translacije.

Povećani nivo iRNK nastaje kao rezultat povećane transkripcije gena ili stabilizacijom informacije na iRNK i ovo je prisutno kod aktivnih alkoholičara. Protein je takođe otporan na razgradnju.

Uopšteno, mehanizam indukcije enzima P450 njihovim supstratima se dešava vezivanjem supstrata (ili sličnih jedinjenja) za intracelularni receptorski protein, što je praćeno vezivanjem tako aktiviranog receptora za RE na ciljnom genu.

- I ako indukcija CYP2E1 povećava uklanjanje etanola iz krvi, posledice ovog procesa su negativne.
- Acetaldehid može da nastaje brže nego što može da se metabolički obradi delovanjem ALDH, što povećava rizik oštećenja jetre.
- Povećan nivo acetaldehida može da uđe u krv i može da ošteti i druga tkiva.
- Dodatno, enzimi citohroma P450 mogu da generišu slobodne radikale, koji dodatno mogu da dovedu do oštećenja jetre i ciroze.

Energija koja se dobija oksidacijom etanola

ATP koji se dobija oksidacijom etanola u acetat zavisi od metaboličkog puta. Ukoliko se etanol oksiduje glavnim putem, citosolnom ADH i mitohondrijalnom ALDH, nastaju jedan citosolni NADH i jedan mitohondrijalni NADH što dovodi do maksimalne sinteze 5ATP-a. Oksidacija acetil- CoA u ciklusu trikarboksilnih kiselina i elektron transportnom lancu generiše 10- visoko energetskih veza. Aktivacija acetata u acetil- CoA troši 2 veze bogate energijom (hidroliza ATP u AMP).

Time je maksimalna količina energije koja se dobija oksidacijom jednog mola etanola 13 ATP.

Sa druge strane, oksidacija etanola u acetaldehid aktivnošću CYP2E1 troši energiju koja je u stvari potrebna za sintezu NADH, što odgovara 2,5 mola ATP. Tako se za svaki mol etanola koji se na ovaj način metabolički obrađuje maksimalno dobije 8.0 mola ATP (10 ATP iz oksidacije ciklusom trikarboksilnih kiselina umanjeno za 2 koja su utrošena za aktivaciju acetata)

II. TOKSIČNI EFEKTI METABOLIZMA ETANOLA

Akutni efekti metabolizma etanola nastaju kao rezultat porasta odnosa NADH /NAD

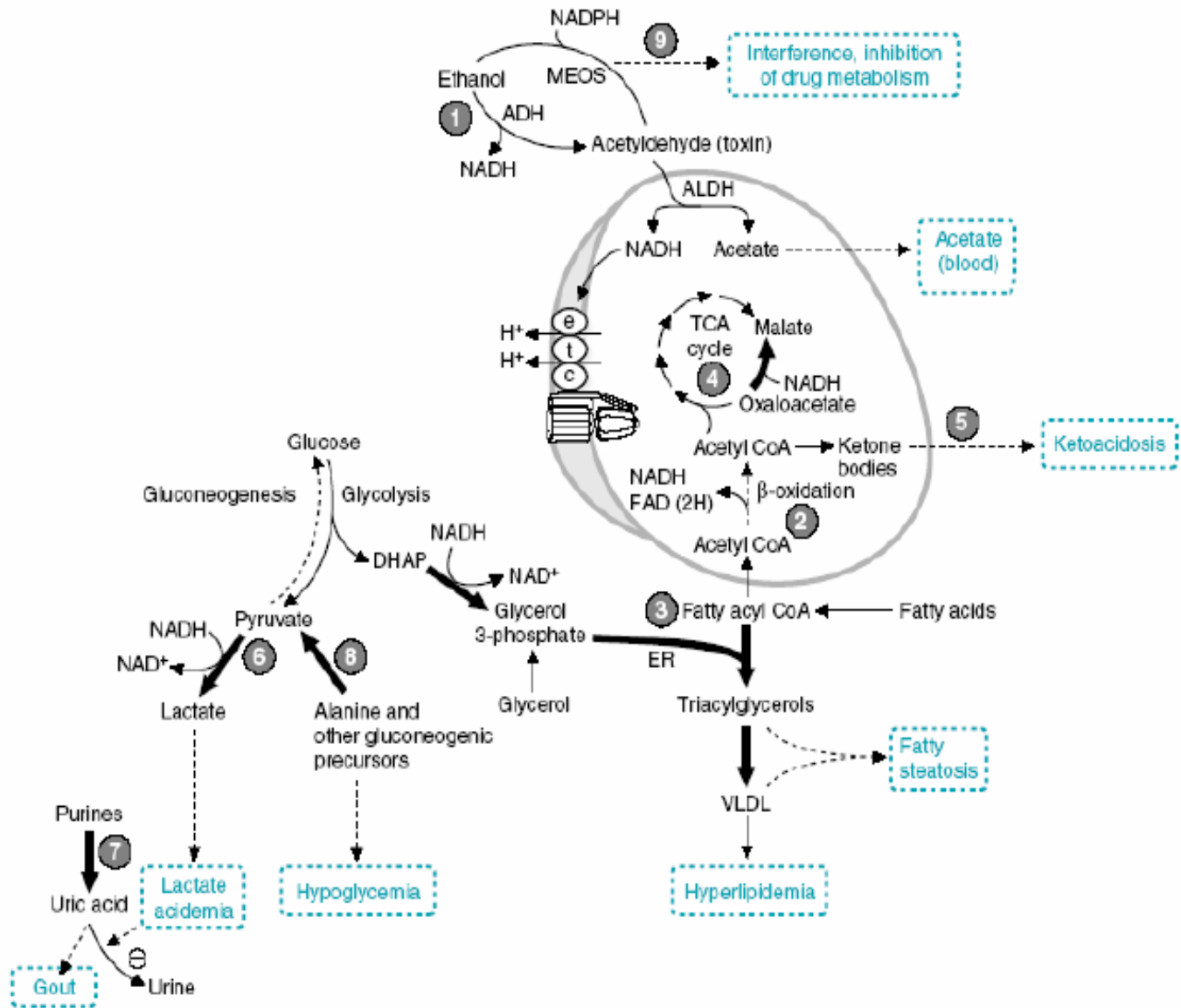
1. PROMENE U METABOLIZMU MASNIH KISELINA

2. ALKOHOLOM INDUKOVANA KETOACIDOZA

3. LAKTIČNA ACIDOZA, HIPERURIKEMIJA I HIPOGLIKEMIJA

Akutni efekti metabolizma etanola na metabolizam lipida u jetri

- (1) U toku metabolizma etanola dolazi do povećanja odnosa NADH/NAD
- (2) Visok nivo NADH/NAD inhibira oksidaciju masnih kiselina kao i ciklus trikarboksilnih kiselina što dovodi do akumulacije masnih kiselina
- (3) Masne kiseline se re-esterifikuju u glicerol 3-P delovanjem acetil transferaze u EPR. Nivo glicerol 3-P se povećava zbog visokog odnosa NADH/NAD koji favorizuje njegovu sintezu iz dihidroksiaceton fosfata (intermedijer glikolize). Etanol stimuliše porast nivoa enzima EPR-a koji favorizuju sintezu TAG.
- (4) NADH koji nastaje u toku oksidacije etanola može da zadovolji potrebe ćelije za ATP-om oksidativnom fosforilacijom. Time je inhibirana oksidacija acetil- CoA u ciklusu trikarboksilnih kiselina
- (5) Visok odnos NADH/NAD pomera oksalacetat (OAA) prema malatu čime se acetil- CoA usmerava u sintezu ketonskih tela



Toksičnost acetaldehida

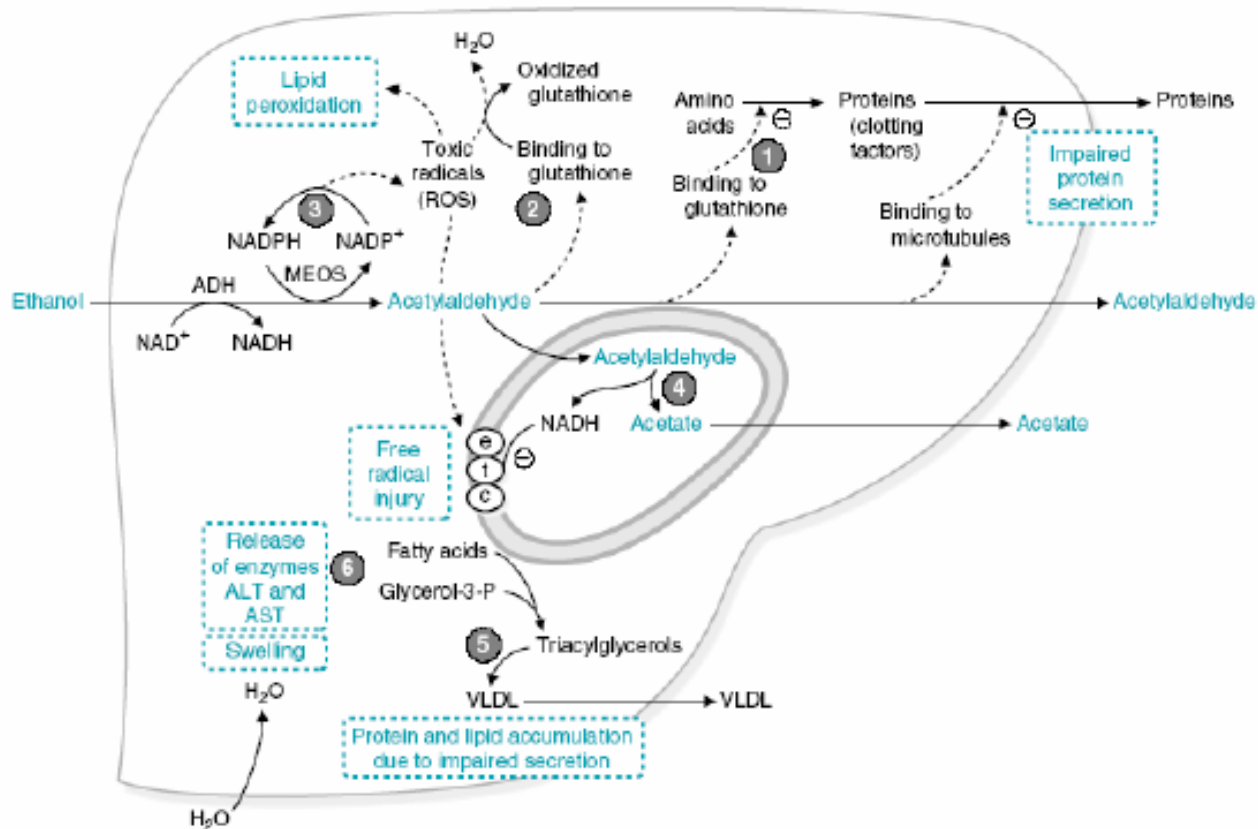
Mnogi toksični efekti hroničnog konzumiranja etanola nastaju kao posledica akumulacije acetaldehida, koji nastaje iz etanola dejstvom ADH i MEOS.

Acetaldehid se akumulira u jetri i oslobađa se u krv po unošenju visokih doza etanola.

On je veoma reaktivan i kovalentno se vezuje za amino grupe, SH grupe, nukleotide i fosfolipide.

1. ACETALDEHID I ALKOHOLOM INDUKOVAN HEPATITIS

2. ACETALDEHID I OŠTEĆENJE SLOBODNIM RADIKALIMA



Razvoj alkoholom indukovanog hepatitisa:

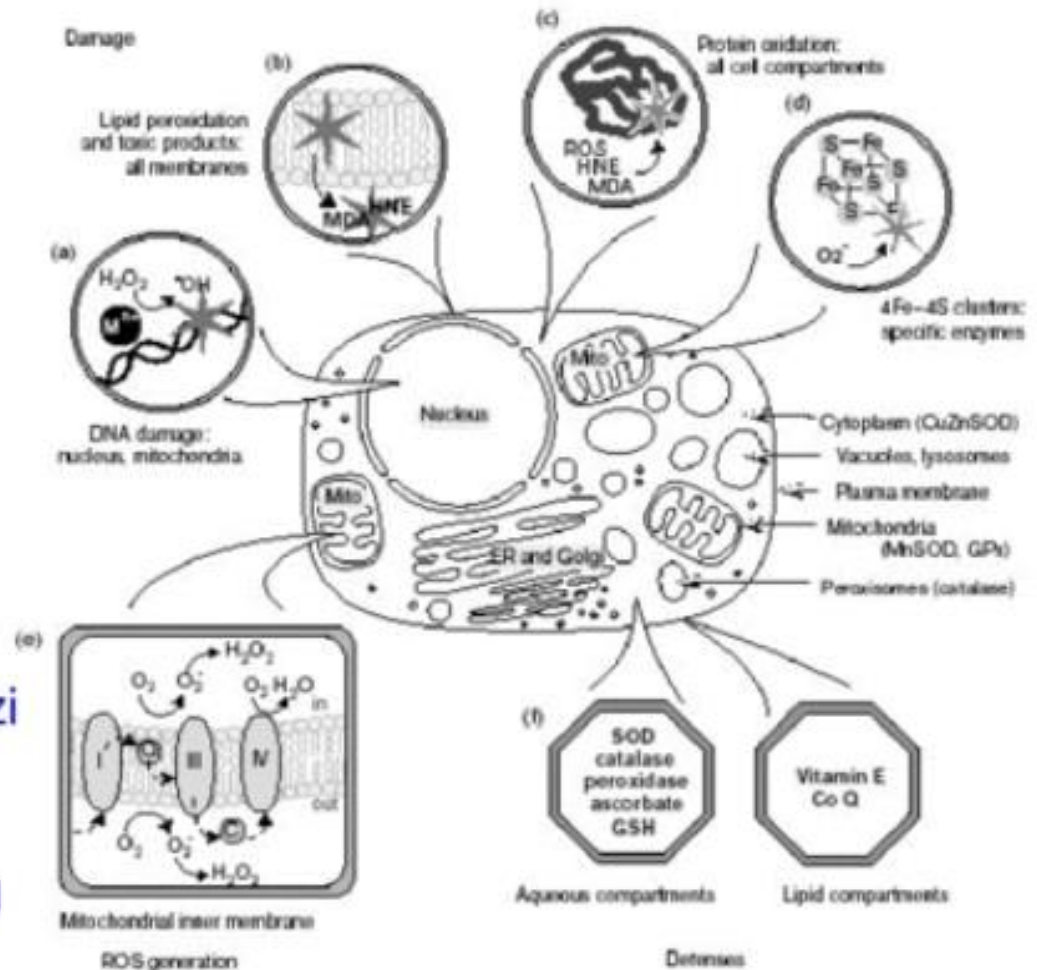
- (1) Nastanak acetaldehida smanjuje sintezu proteina i ugrožava sekreciju proteina
- (2) Oštećenje slobodnim radikalima nastaje zbog vezivanja acetaldehida za GSH
- (3) Indukcija MEOS povećava nastanak slobodnih radikala, što dovodi do lipidne peroksidacije i oštećenja ćelija
- (4) Oštećenje mitohondrija inhibira elektron transportni lanac čime se smanjuje oksidacija acetaldehida
- (5) Oštećenje mikrotubula povećava nivo VLDL kao i akumulaciju proteina
- (6) Oštećenje ćelija dovodi do oslobađanja hepatičnih enzima ALT i AST

Oksidativni stres i antioksidansi



Kisik i oksidativni stres

- Zrak sadrži 21% kisika, O_2
- Životinje, biljke i aerobne bakterije trebaju kisik za stvaranje energije (ATP)
- Kisik je toksičan za sve žive oblike, bilo anaerobne ili aerobne
- Život na Zemlji postoji u sprezi s antioksidacijskim staničnim sustavom koji zamjenjuje i uklanja produkte oksidacijskog stresa u in vivo sustavima



Slobodni radikali i antioksidansi

- Što su slobodni radikali?
- Što su reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi (reactive oxygen species, ROS i reactive nitrogen species, RNS)
- Jesu li ROS/RNS uvijek opasni?
- Dobro poznati pojam „oksidativni stres“ – što je to?
- Poremećaji vezani uz oksidativni stres
- Markeri oksidacijskog stresa
- Antioksidansi

Slobodni radikali – što su to?

- čestice s nesparenim elektronom (može biti atom, ion ili molekula)
- nastaju npr. homolitičkim cijepanjem veze



- nastoje postići ravnotežno stanje, te reagiraju s elektronom najbliže molekule
- većina biomolekula nisu radikali

Enzimski izvori	Nenzimski izvori
<ul style="list-style-type: none"> • NAD(P)H OKSIDAZE $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD(P)}^- + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$ <ul style="list-style-type: none"> • KSANTIN OKSIDAZE • AZOT-MONOKSID SINTAZE • MIJELOPEROKSIDAZE $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ <ul style="list-style-type: none"> • LIPOKSIGENEZE 	<ul style="list-style-type: none"> • DISANJE U MITOHONDRIJAMA • TRANZICIONI METALI • DRUGI OKSINANSI (LOO.)

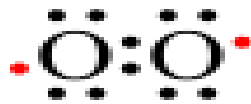
Uzroci oksidativnog stresa

1. Neizbalansirana **ishrana**
2. Izlaganje **životnoj sredini**
3. **Nasledne bolesti**
4. **Naporne fizičke aktivnosti**
5. **Povrede (traume)**

Posledice oksidativnog stresa

1. Povećano stvaranje **oksidanasa**
2. Smanjena **antioksidativne zaštite**
3. Neuspešno uklanjanje oštećenja

Reaktivni kisikovi radikali



1



2



3



4



5

Levisova struktura reaktivnih vrsta kiseonika:



- 1 - tripletni kiseonik;
- 2 - singletni kiseonik;
- 3 - superoksid;
- 4 - vodonik peroksid;
- 5 - hidroksilni radikal

ROS (reaktivni kisikovi spojevi)

Slobodni radikali

superoksid, $O_2^{\cdot -}$

hidroksilni radikal, $\cdot OH$

peroksilni radikal, $ROO\cdot$

alkoksilni radikal, $RO\cdot$

hidroperoksilni radikal,

$HO_2\cdot$

Spojevi koji nisu slobodni radikali

vodikov-peroksid, H_2O_2

hipokloritna kiselina, $HClO$

ozon, O_3

singletni kisik, 1O_2

Kisik nije molekula koja izravno izaziva oksidativni stres, ali je prekursor svih ROS.

RNS (reaktivni dušikovi spojevi)

Slobodni radikali

dušikov-(II)- oksid, $\cdot\text{NO}$

dušikov-(IV)-oksid, $\cdot\text{NO}_2$

Spojevi koji nisu slobodni radikali

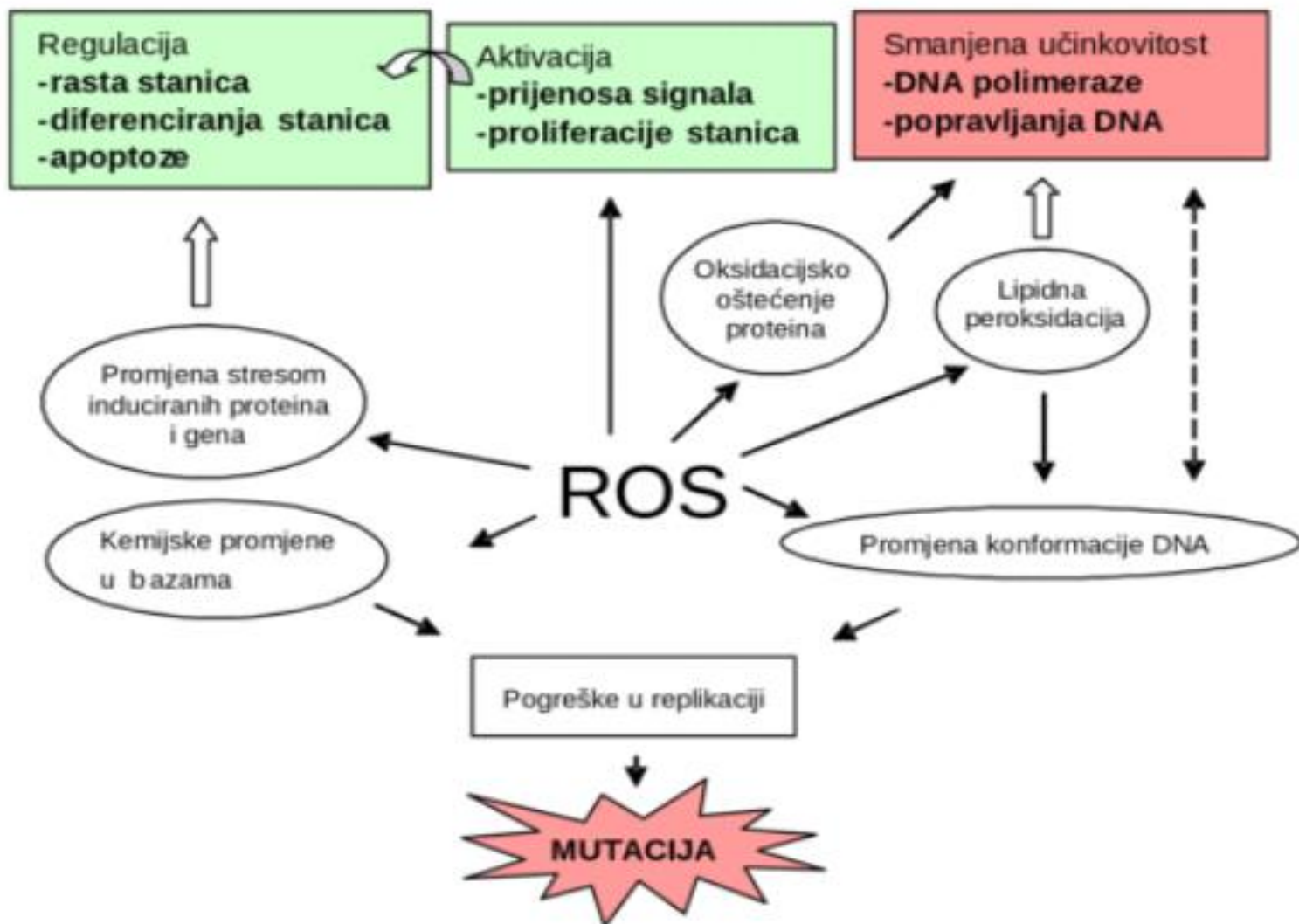
nitrozil, NO^+

nitritna kiselina, HNO_2

peroksinitrit, ONOO^-

alkilperoksinitrit, ROONO

Posljedice djelovanja ROS



Uloga ·NO u metabolizmu

- u stanicama vaskularnog endotela djeluje **vazodilatacijski** i regulira **krvni tlak**
- u SŽS-u kao **neurotransmitter** djeluje na više funkcija, uključujući pamćenje
- na periferiji djeluje preko **neadrenergičnih nekolinergičnih** živaca **regulirajući funkcije** raznih organa
- stvara se u **makrofagima** njihovom aktivacijom i djeluje **citotoksično** na bakterije, gljivice, protozoe i tumorske stanice
- nadzire i sprječava **agregaciju trombocita**

Uloga $O_2^{\cdot -}$ u metabolizmu

- Superoksid nastao djelovanjem NADPH oksidaze i njegov derivat, peroksinitrit, imaju ulogu u **regulaciji krvnog tlaka**
- Dio je **citotoksičnog mehanizma** pojedinih stanica imunološkog sustava

*Poremećaj ravnoteže između stvaranja
i eliminacije ROS uzrokuje*

Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje kao
posljedica 3 čimbenika:

- 1) povećano stvaranje oksidansa
- 2) smanjenje antioksidativne zaštite
- 3) neuspješan popravak oštećenja

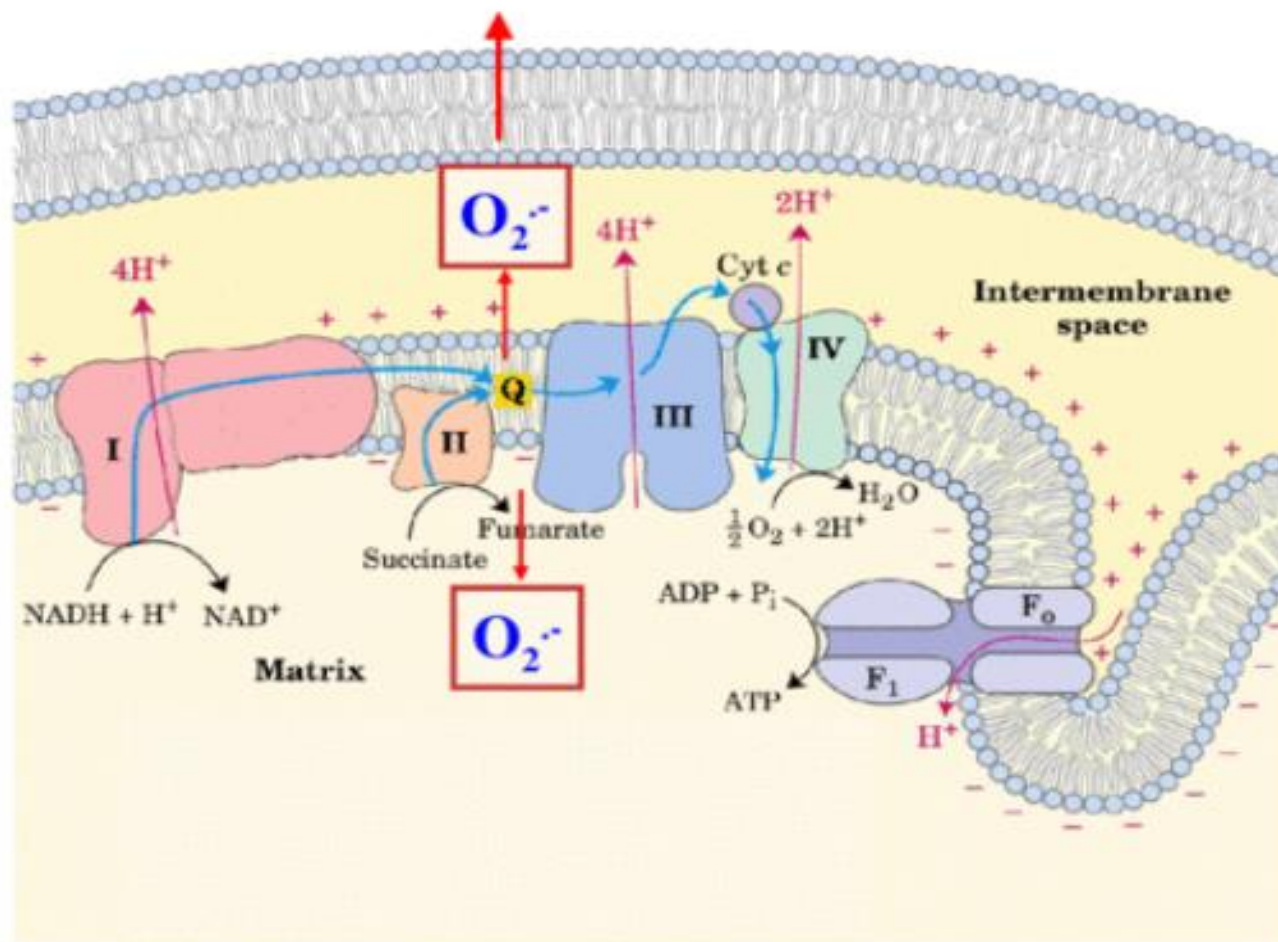
Glavni izvori slobodnih radikala

Enzimi ili/i koenzimi s flavinskim strukturama, hemski koenzimi, enzimi koji sadrže Cu i Fe u aktivnom središtu

-reakcije prijenosa elektrona

1. *respiratorni lanac u mitohondriju*: uglavnom superoksid, a zatim H_2O_2

Uloga kisika u respiracijskom procesu

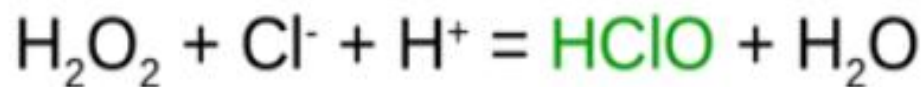


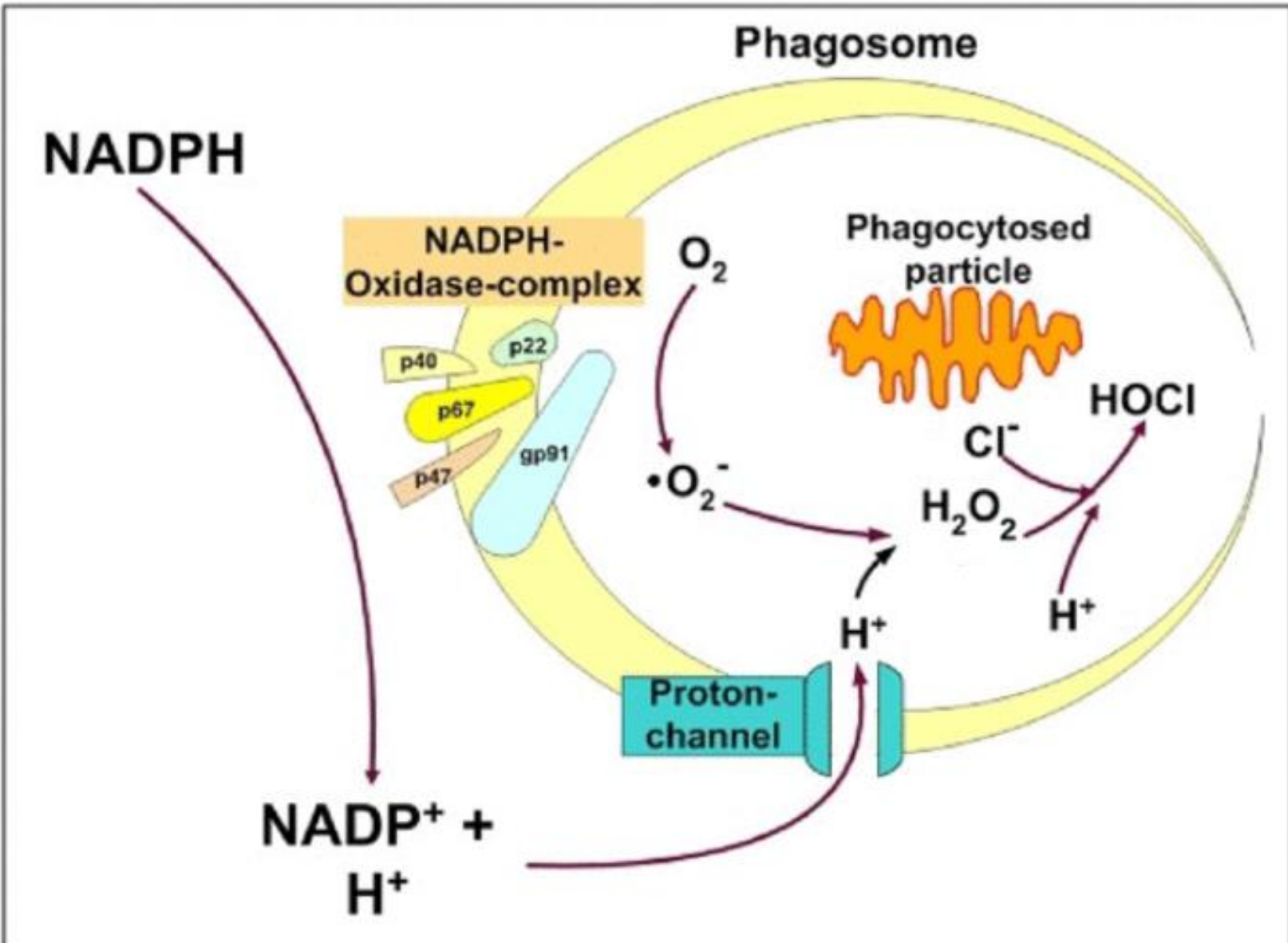
Glavni izvori slobodnih radikala

2. *posebne stanice* (leukociti, makrofagi i dr.)

stvaranje superoksida putem NADPH-oksidaze

superoksid može reagirati s vodikom i stvoriti vodikov peroksid a potom i **hipokloritnu kiselinu**



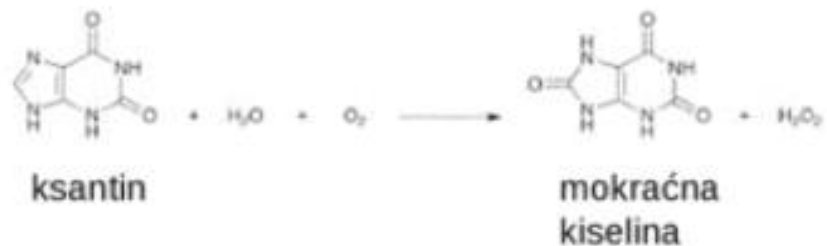


Glavni izvori slobodnih radikala

3. *endoplazmatski retikulum*
citokrom P- 450 (CYP)

4. *oksidacija hemoglobina*
glutation

5. *enzimi*
ksantin oksidaza



Oksidacijsko oštećenje DNA

Oštećenje

- disocijacija šećernih komponenti
- modifikacija baza
- pucanje prstena

Posljedica

- pogreške pri translaciji
- inhibicija sinteze proteina
- mutacije
- kancerogeneza

Oksidativna oštećenja lipida

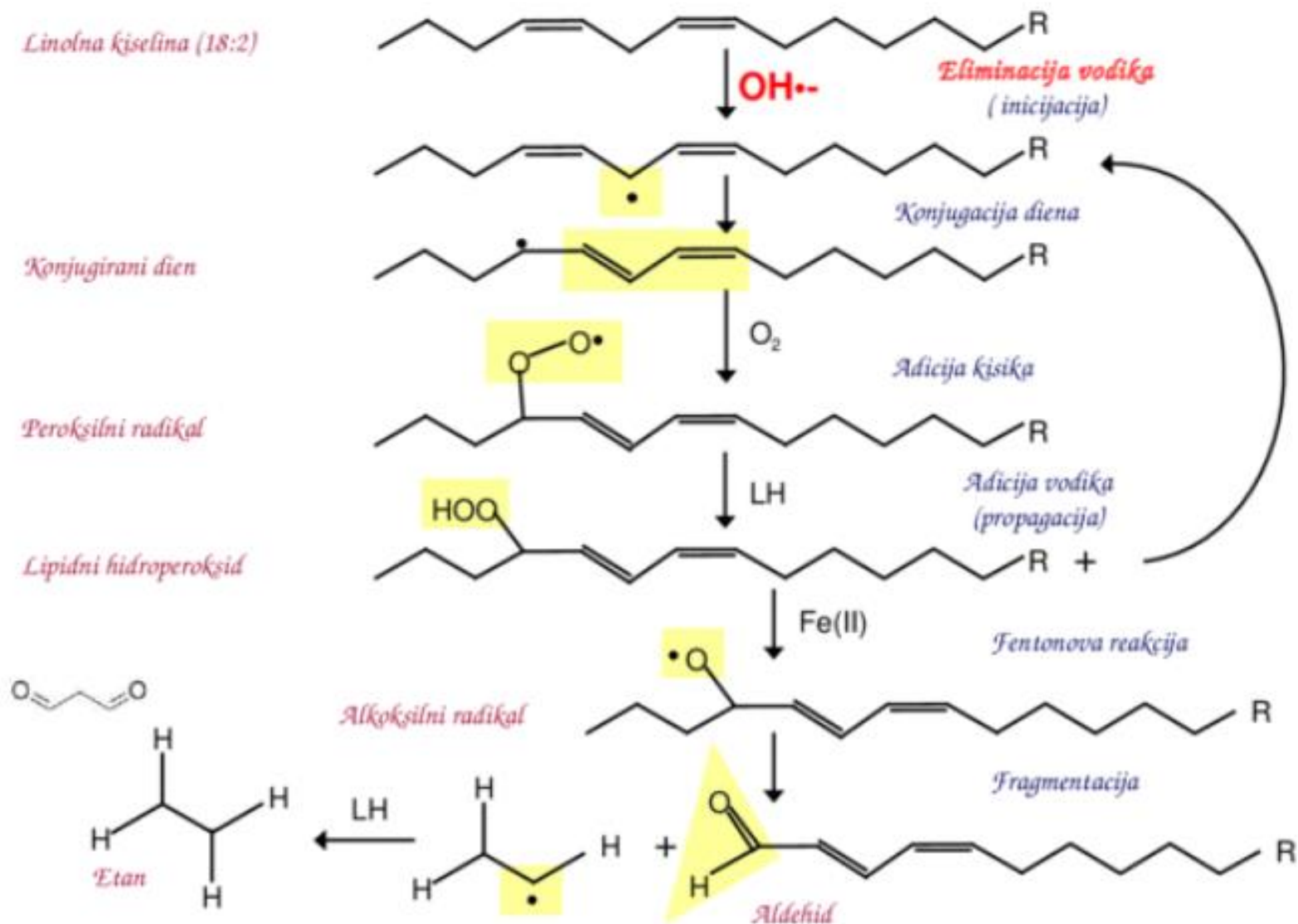
Oštećenje

- lipidna peroksidacija
- oksidacija lipoproteina

Posljedica

- promjena u fluidnosti i permabilnosti membrana
- utjecaj na integrirane enzime
- stvaranje reaktivnih metabolita (malondialdehida (**MDA**), 4-hidroksinonenala (**HNE**), izoprostana i drugih produkata lipidne peroksidacije)

Lipidna peroksidacija: inicijacija i propagacija



Oksidacijsko oštećenje proteina

Oštećenje

- agregacija, fragmentacija i raspad
- modifikacija funkcionalnih skupina

Posljedica

- promjene u enzimskoj aktivnosti, ionskom transportu

1- tipovi oksidacijske modifikacije proteina

- **proteinski karbonili** (postranični aldehidi, ketoni)
- nitrozilacija proteina (3-nitrotirozin, **3-NT**)
- hidroperoksilni derivati alifatskih aminokiselina
- aminokiselinske interkonverzije (*npr.* His u Asn; Pro u OH-Pro)
- aminokiselinski oksidacijski produkti (*npr.* *p*-hidrokisfenilacetaldehid)
- disocijacija peptidnih veza

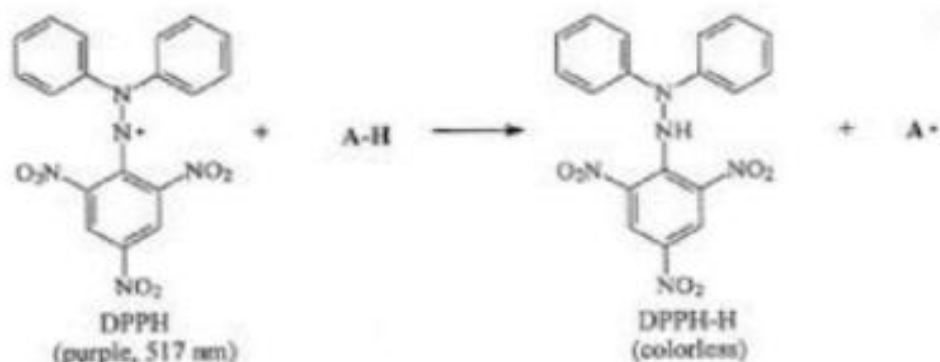
Biljezi oksidativnog stresa

Detekcija slobodnih radikala

- vrlo komplicirano, zbog kemijskih i fizikalnih svojstava (kratak poluživot)

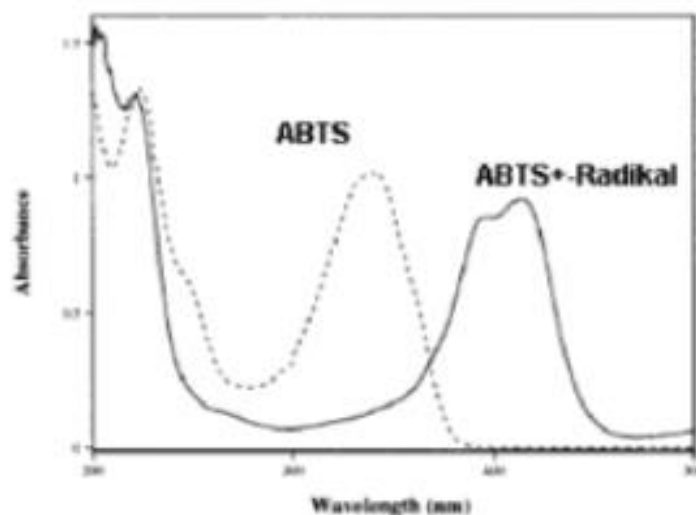
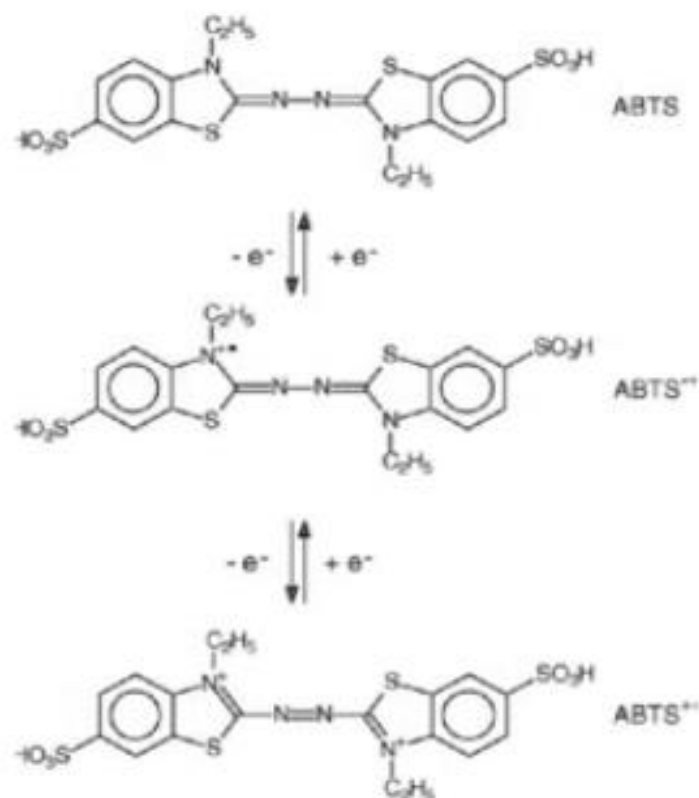
DPPH[•]; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil hidrat

stabilan radikal



Biljezi oksidativnog stresa

ABTS; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)



Biljezi oksidativnog stresa

Detekcija produkata oksidacijskog stresa

Biljezi lipidne peroksidacije:

malondialdehid (MDA), konjugirani dieni, 4-hidroksinonenal (HNE), izoprostani

Biljezi oksidativnog oštećenja proteina:

proteinski karbonili, 3-NT, proteinski hidroperoksidi

Biljezi oksidativnog oštećenja DNA:

modificirani nukleozidi (8-OHdG)

Kako djeluju antioksidansi

- 1) izravno enzimskom katalizom uklanjaju ROS
-SOD, GSHPx, CAT
- 2) reagiraju sa slobodnim radikalima, pretvaraju ih u neradikale dajući im elektron a sami postaju **slabo reaktivni** radikali
-vitamin C, vitamin E
- 3) kelatiraju ione željeza i bakra
-transferin, metalotioneini
- 4) štite biomolekule od oštećenja drugim mehanizmima
-proteini toplinskog stresa (heat shock proteins, HSP)

Antioksidansi

enzimi (citokrom c, SOD, GSHPx, katalaza)

neenzimatski antioksidansi

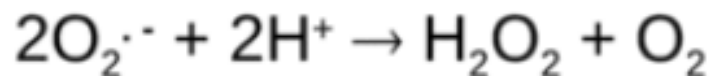
u membranama (α -tokoferol, β -karoten,
koenzim Q₁₀)

izvan membrana (askorbat, transferin, bilirubin)

hvatači slobodnih radikala („scavengers“*etici*
SOD)

prijelazni elementi (Se, Zn)

Superoksid-dizmutaze



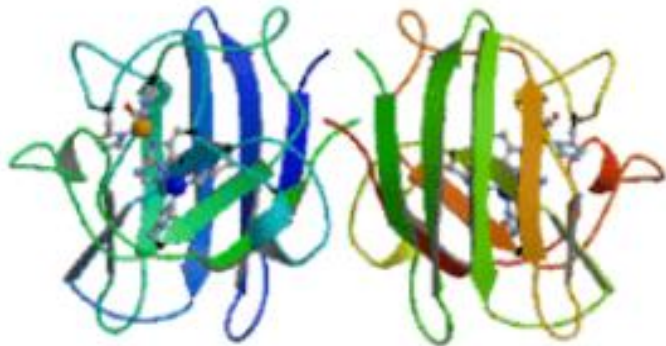
SOD - nalazi se u svim stanicama koje metaboliziraju kisik

3 vrste SOD:

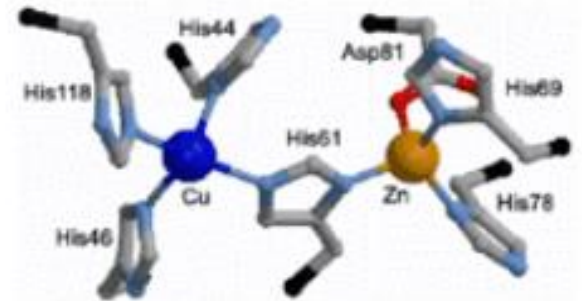
- 1) mitohondrijska (Mn SOD)
- 2) citosolna (CuZn SOD)
- 3) izvanstanična (EcSOD)

potrebni različiti kofaktori (metali)

Superoksid-dizmutaze



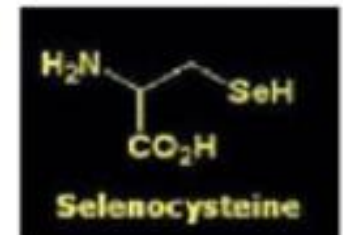
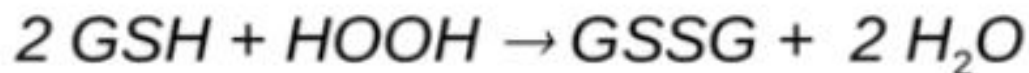
Aktivno mjesto goveđe SOD (CuZnSOD) leži u šupljini koju tvore dvije petlje. Aktivno mjesto sadrži jedan bakrov i jedan cinkov ion, premoštene imidazolnim prstenom His61. Bakar je koordiniran sa sljedeća tri histidinska liganda i molekulom vode, dok je cink koordiniran s dva histidina i aspartatom.



Glutation-peroksidaze (GSHPx) (Se)

Enzim koristi glutation kao donor elektrona za obnovu reduciranog oblika selenocisteina

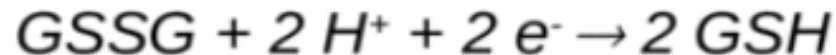
Eliminacija hidroperoksida i H_2O_2



- *citosolna i mitohodrijska GSHPx*
- *izvanstanična GSHPx*
- *fosfolipid-hidroperoksidna GSHPx*

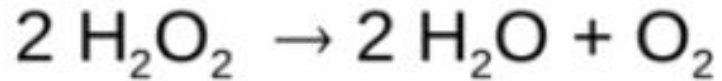
Glutation-reduktaza (GR)

Obnavljanje reduciranog oblika glutaciona (GSH)



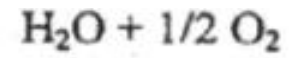
Katalaza (CAT)

(Fe)

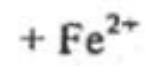
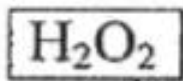
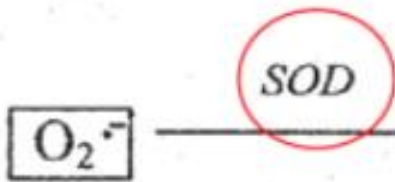


Prilikom uobičajenog stvaranja peroksida (putem hemoglobina i SOD-a) veću aktivnost pokazuje GPx, dok se katalaza uključuje pri **većem stvaranju peroksida**

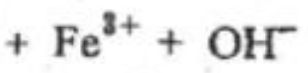
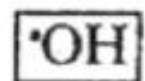
peroksisomi, mitohondriji hepatocita, eritrociti



katalaza

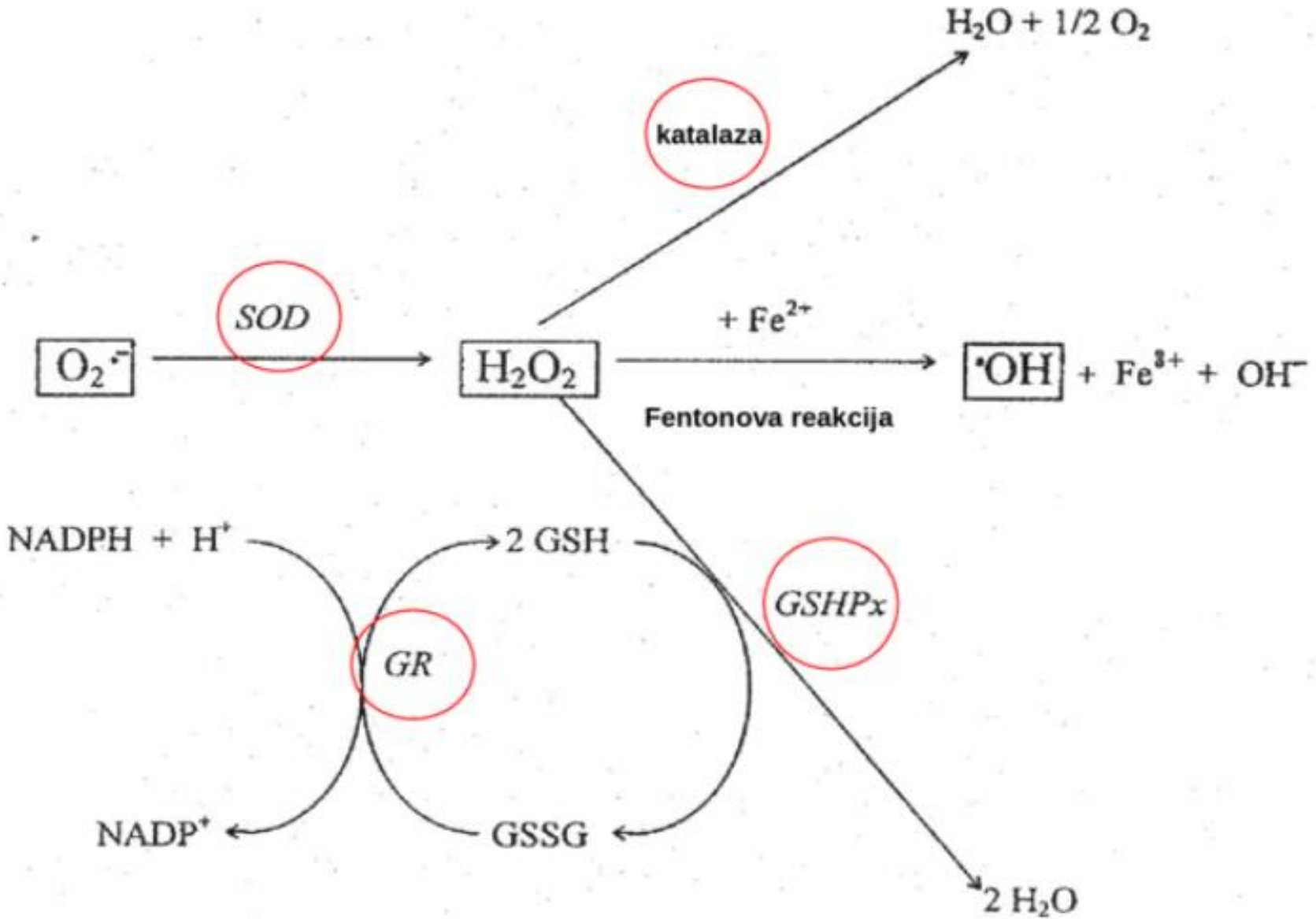
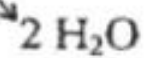


Fentonova reakcija



GR

GSHPx



Neenzimski obrambeni sustav

Visokomolekularni antioksidansi (vezuju ione željeza ili bakra)

- transferin
- ceruloplazmin
- feritin
- haptoglobin
- hemopeksin
- albumin
- metalotioneini

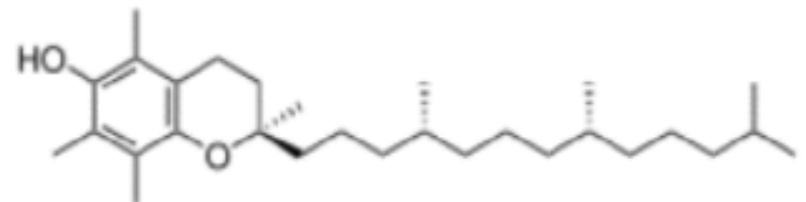
Niskomolekularni antioksidansi

Askorbat (vitamin C)

- redukcijsko sredstvo
- sinteza kolagena, karnitina, neurotransmitera
- povećava apsorpciju Fe
- regeneracija tokoferilnog radikala
- ponekad prooksidans

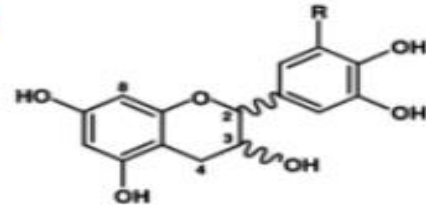
Tokoferoli (vitamin E) 8 izomera

lokaliziran u membranama;
zaštita od oštećenja



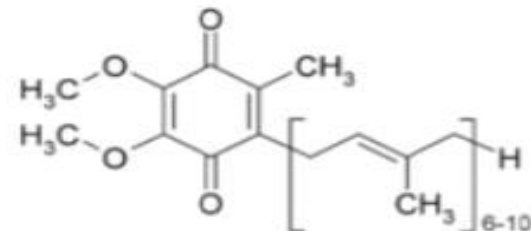
Niskomolekularni antioksidansi

polifenoli, npr. flavonoidi



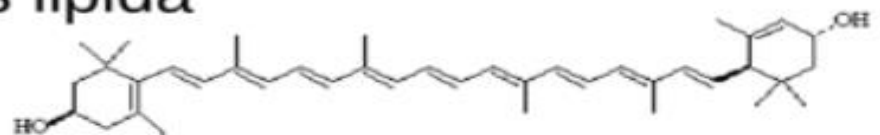
- *ubikinon* (koenzim Q)

prijenosnik elektrona u respiratornom lancu
kooperacija sa tokoferolom



- *karotenoidi: lutein, β-karoten, vitamin A*

odstranjivanje radikala s lipida



- **glutation** (GSH, GSSG)

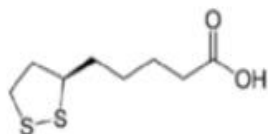
važan redoks sustav u stanicama sisavaca (1-10 mmol/l)



eliminacija ROS, stabilizacija redukcijskih oblika (SH-skupine, regeneracija tokoferola i askorbata)

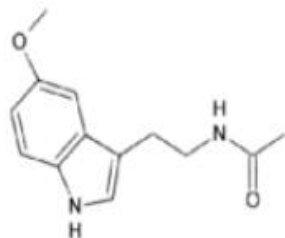
supstrat *glutation-peroksidaze*

- **liponska kiselina**



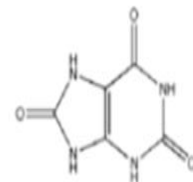
regeneracija tokoferola i askorbata

- **melatonin**

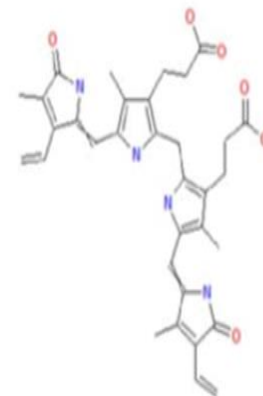


lipofilan; hvatač hidroksilnih radikala

- **mokraćna kiselina (urati)**



- **bilirubin**



Metali s antioksidacijskom ulogom

Selen

Utječe na resorpciju vitamina E, dio je selenoproteina

Cink

Stabilizira staničnu membranu, povećava imunitet