

## Oksidativni stres

Oxidative stress

Osredkar Joško

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Univerzitetni inštitut za klinično kemijo in biokemijo

### Korespondenca/ Correspondence:

Osredkar Joško  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

### Ključne besede:

oksidativni stres, radikali

### Key words:

oxidative stress, free radicals

### Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;  
81: 393–406

Prispelo: 14. mar. 2011,  
Sprejeto: 6. maj. 2011

### Izvelek

Človeški organizem je izpostavljen vplivom različnih oblik stresa, tako fizičnega, psihičnega ali kemičnega, vsem pa je skupno, da lahko negativno vplivajo na naš organizem. Določena količina stresa je vedno prisotna in nekako usmerja, pospešuje ali zavira delovanje človeškega telesa. Žal pa smo dandanes preveč in prepogosto izpostavljeni čezmernemu stresu, kar ima zagotovo škodljive posledice.

To velja tudi za posebno vrsto stresa, ki jo imenujemo oksidativni stres. Tej obliki stresa so zaradi pridobivanja energije s pomočjo kisika izpostavljeni vsi aerobni organizmi. Za tovrstni stres bi lahko rekli, da je prav nevidno vpleten v naše življenje, saj opozori nase šele ob izbruhu določenih bolezni. Škodljivega vpliva radikalov, katerih presežek predstavlja glavni razlog za oksidativni stres, se danes že dobro zavedamo. Vendar pa pri tem ostaja ključni problem zaznavanja oksidativnega stresa, kar bi nam omogočilo pravočasno ukrepanje in preprečilo izbruh mnogokaterih bolezni današnjega časa.

Dejavnikov, ki pospešujejo oksidativni stres, je namreč veliko, mednje prav gotovo sodi hiter življenjski slog in onesnaženost okolja. Povečanje oksidativnega stresa pa lahko sproži tudi intenzivna telesna dejavnost, pri kateri v večjem obsegu potekajo oksidativni procesi v organizmu s posledičnim povečanim nastajanjem reaktivnih kisikovih spojin.

Morda se zdi to dejstvo ob splošnem zagovarjanju gibanja na prvi pogled protislovno, vendar to potrjujejo različne raziskave pri aktivnih športnikih. Trening vrhunskega športnika namreč vsakodnevno vključuje izjemen telesni napor, ki se zrcali tudi na oksidativnem stanju organizma. Vendar pa je pri tem potrebno upoštevati, da imajo vrhunski športniki v primerjavi z običajnimi posamezniki spodbujen obrambni sistem, ki lahko ustrezno uravnava negativne posledice oksidativnega stresa. Ravno nasprotno pa velja za neredno ali pretirano telesno dejavnost, na katero telo ni prilagojeno.

### Abstract

The human organism is exposed to the influence of various forms of stress, either physical, psychological or chemical, which all have in common that they may adversely affect our body. A certain amount of stress is always present and somehow directs, promotes or inhibits the functioning of the human body. Unfortunately, we are now too many and too often exposed to excessive stress, which certainly has adverse consequences.

This is especially true for a particular type of stress, called oxidative stress. All aerobic organisms are exposed to this type of stress because they produce energy by using oxygen. For this type of stress you could say that it is rather imperceptibly involved in our lives, as it becomes apparent only at the outbreak of certain diseases. Today we are well aware of the adverse impact of radicals, whose surplus is the main cause of oxi-

ductive stress. However, the key problem remains the detection of oxidative stress, which would allow us to undertake timely action and prevent outbreak of many diseases of our time.

There are many factors that promote oxidative stress, among them are certainly a fast lifestyle and environmental pollution. The increase in oxidative stress can also trigger intense physical activity that is directly associated with an increased oxygen consumption and the resulting formation of free radicals.

Considering generally positive attitude to physical activity, this fact may seem at first glance contradictory, but the finding has been confirmed by several studies in active athletes. Training of a top athlete daily demands great physical effort, which is also reflected in the oxidative state of the organism. However, it should be noted that the top athletes in comparison with normal individuals have a different defense system, which can counteract the negative effects of oxidative stress. Quite the opposite is true for irregular or excessive physical activity to which the body is not adapted.

## 1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je vrsta "kemičnega stresa", ki je prisoten v živih organizmih zaradi povečane količine potencialno škodljivih agensov, t.i. reaktivnih kisikovih zvrsti – ROS (*angl.* reactive oxygen species). Po definiciji je oksidativni stres neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine teh visoko reaktivnih zvrsti na celice in tkiva v organizmu.<sup>1</sup> Gre za patološko stanje, ki se pojavi zaradi prevelike tvorbe radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov.

Majhne količine ROS nastajajo tudi v normalnih okoliščinah med fiziološko presnovo celic. Sinteza nekaterih hormonov prav tako vključuje tvorbo radikalov. Nadalje proizvajajo radikale nekatere vrste levkocitov kot orožje za uničenje bakterij, kar zagotavlja pomemben obrambni mehanizem pred okužbami. S tega vidika so radikali nenadomestljivi spremljevalci celične presnove. Vendar pa v določenih okoliščinah njihova količina postane prevelika, kar za celice pomeni smrtno grožnjo. Povečano količino radikalov lahko sprožijo številni zunanji dejavniki kot npr. različne vrste sevanja, nekatere kemikalije, kot so pesticidi ali določena zdravila, ter virusi in bakterije. Med notranje dejavnike pa lahko štejemo povečano stopnjo celične presnove, ki nastane pri določenih boleznih (debelost, sladkorna bolezen, rak ...) ali zaradi intenzivne telesne obremenitve pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov.<sup>1</sup>

Oksidativni stres je odgovoren za zgodnje staranje ter za vrsto pomembnih bole-

zni, kot so npr. ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena, nekatere vrste raka in druge.<sup>1-3</sup> V nasprotju s temi boleznimi oksidativni stres ne kaže simptomov oz. nima tipične klinične slike, ki bi opredelila njegovo prisotnost v organizmu.<sup>1</sup> Vendar pa je pomembno, da se njegove prisotnosti zavedamo ter jo poskušamo nadzorovati zlasti v tveganih okoliščinah.

Pojav oksidativnega stresa je neobhodno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju, ki pa je hkrati nujen za naš obstoj. Nesporno je kisik ena tistih anorganskih molekul, brez katerih naše življenje v obstoječi obliki ne bi bilo mogoče. A vendar si lahko predstavljamo visoko reaktivnost kisika, ki zmore spreminjati železo v rjo. Prav gotovo tudi v organizmu potekajo oksidacijski procesi; čeprav tega ne opazimo neposredno, to potrjujejo različni kisikovi presnovki.

## 2. Reaktivne kisikove vrste (reactive oxygen species – ROS)

Kisik je nujno potreben za življenje in prehaja v telo s procesom dihanja, hkrati pa pri tem nastajajo mnoge reaktivne kisikove vrste. Mednje ne sodijo samo prosti kisikovi radikali, kot sta hidroksilni in superoksidni radikal, temveč tudi druge spojine, npr. vodikov peroksid in ozon.<sup>1</sup> Vsem reaktivnim kisikovim spojinam pa je skupno, da so visoko reaktivne in lahko oksidirajo katero koli organsko molekulo v organizmu od ogljikovih hidratov, maščob ali aminokislin. Ta-

bela 1 prikazuje pomembne reaktivne vrste kisika, ki jih lahko razdelimo na radikalske in neradikalske vrste.

Reaktivnost kisika izvira iz elektronske strukture molekule kisika, pri čemer sta na zunanji orbitali prisotna dva neparjena elektrona. Zato lahko molekulo kisika označimo kot biradikal. Ključno pri tem je, da imata ločena elektrona enako usmerjena spina, kar opredeljuje tripletno osnovno stanje molekule. Zaradi takšne usmeritve spinov pride do izraza tudi efektivni magnetni moment, zaradi česar nastane paramagnetnost. Tako v naravi najdemo kisikove molekule predvsem v tripletnem stanju, ki je v tem primeru energetsko najnižje. To pa je ravno obratno kot pri večini ostalih spojin, kjer je osnovno stanje z najnižjo energijo singletno.<sup>4,5</sup>

### 2.1 Neradikalske vrste kisika

*Tripletni kisik* ( $^3\text{O}_2$ ) je molekularni kisik, ki se nahaja v našem ozračju. Načeloma je slabo reaktiven, saj mora zaradi paralelnih spinov obeh neparjenih elektronov v oksidacijskih procesih pridobiti manjkajoča elektrona postopoma. Proces se pospeši ob prisotnosti reaktivnih molekul, radikalov ali prehodnih elementov in lahko sproži različne reakcije, ki vodijo do nastanka novih radikalov. Reaktivnost molekule kisika pa lahko naraste, tudi če se spremeni smer enega od spinov neparjenih elektronov, kot je to v primeru singletnega kisika.<sup>4,6</sup>

*Singletni kisik* ( $^1\text{O}_2$ ) poznamo v osnovnem in vzbujenem stanju. Slednji je zelo kratkoživ, zaradi česar je njegov vpliv zanemarljiv. Kisikov singlet v osnovnem stanju

nastane iz tripletne oblike, pri čemer se neparjeni elektron pomakne v orbitalo višje energije, tako da se tvori elektronski par z nasprotno usmerjenima spinoma. Je zelo reaktiven, saj na preostalo prosto orbitalo z lahkoto sprejme nov elektron ali kar elektronski par.<sup>6</sup> Nastane pri nekaterih kemičnih reakcijah in fotokemično, nadalje pa sproži reakcije, ki vodijo do nastanka endoperoksidov. V organizmu ponavadi nastaja pri fotodermatozah in osvetlitvah riboflavina. Temu primerno so tudi morebitne patološke spremembe omejene le na osvetljene dele kože.<sup>7,8</sup>

*Ozon* ( $\text{O}_3$ ) je triatomska molekula, sestavljena iz treh atomov kisika. Običajno nastaja preko fotodisociacije molekularnega kisika, kjer najprej nastane atomski kisik, le-ta pa nadalje reagira z molekularnim kisikom, da nastane ozon. Ozon je kisikov alotrop, ki je veliko manj stabilen od običajnega kisika. Čeprav ni radikal, je močan oksidant, veliko boljši od kisika. V organizmu lahko sproži nastanek radikalov bodisi preko reakcij s poli-nasičenimi maščobnimi kislinami ali avtooksidacije lipidov. Hkrati lahko v vodnih raztopinah sproži tvorbo hidroksilnega radikala.<sup>4</sup>

### 2.2 Radikalske vrste kisika

Radikali so posamezni atomi, ioni in molekule ali njihovi deli, ki imajo na vsaj eni orbitali neparjeni elektron.<sup>1,4,5</sup> Število elektronov je lahko sodo ali liho, pri čemer je pri sodem številu elektronov vsak elektron v svoji  $\pi$ -razvezni orbitali. Čeprav so radikali sposobni obstajati samostojno, so zaradi primanjkljaja elektronov, odgovornega za

**Tabela 1:** Reaktivne kisikove vrste.

Radikalske vrste		Neradikalske vrste	
superoksidni anion	$\text{O}_2^{\cdot -}$	tripletni kisik	$^3\text{O}_2$
hidroksilni radikal	$\text{OH}^{\cdot}$	singletni kisik	$^1\text{O}_2$
hidroperoksidni rad.	$\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$	ozon	$\text{O}_3$
alkoksilni radikal	$\text{RO}^{\cdot}$	vodikov peroksid	$\text{H}_2\text{O}_2$
peroksidni radikal	$\text{ROO}^{\cdot}$	hidroperoksid	$\text{ROOH}$
aroksidni radikal	$\text{ArO}^{\cdot}$	peroksidi	$\text{ROOR}^{\cdot}$
semikinonski radikal	$\text{UQ}^{\cdot}$	hipoklorna kislina	$\text{HClO}$

kemijsko nestabilnost, večinoma zelo kratkoživi in zato visoko reaktivni. Reagirajo z molekulami v svoji sosesčini z namenom pridobiti manjkajoči elektron, ki mora imeti nasprotno smer spina kot nesparjeni elektron.<sup>2</sup> Med radikale z lihim številom elektronov prištevamo: alkoksilni radikal (RO<sup>•</sup>), hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>), alkilni radikal (R<sup>•</sup>) ter druge. Biološko pomembni so predvsem kisikovi, ogljikovi, dušikovi in klorovi radikali.<sup>6</sup>

### 2.3 Nastanek radikalov

Radikali nastajajo v naravi po različnih mehanizmih, nato lahko nadalje tvorijo nove radikale ali pa pride do njihove inaktivacije.

### 2.4 Reakcije radikalov

Zaradi izjemne reaktivnosti in težnje po zapolnitvi vrzeli na eni izmed orbital radikali zelo hitro reagirajo z bližnjimi molekulami, najpogosteje na tri načine:

- odvzem vodikovega atoma,
- adicija na dvojno vez,
- reakcija dveh radikalov.

Pomembne so predvsem reakcije med radikali in neradikali. Pri reakciji med dvema radikaloma se prosta elektrona združita v kovalentno vez, pri reakciji med radikalom in neradikalom pa vedno nastane novi radikal.<sup>5</sup> Ker je v telesu večina molekul neradikalnih, lahko na ta način že en sam radikal sproži obsežno *verижno reakcijo*.

### 2.5 Nastanek ROS v fizioloških procesih

V živih organizmih nastajajo ROS med normalno presnovno aktivnostjo celic. Vendar pa lahko na to vplivajo tudi zunanji dejavniki, nekateri celo neposredno.

V celici obstaja pet primarnih metabolnih mest za sintezo ROS: celična membrana, mitohondriji, peroksisomi, mikrosomi (endoplazemski retikulum) in ostali viri citosola.<sup>1</sup>

### 2.6 Nastanek ROS v patoloških procesih

Ne glede na nastanek reaktivnih kisikovih vrst lahko njihov presežek povzroči vrsto strukturnih in funkcijskih poškodb v sami celici, zlasti pri nezadostnem antioksidantnem obrambnem mehanizmu. Poškodbe so lahko epigenetične (poškodbe strukturnih in funkcijskih molekul celice) ali genotoksične (posredne ali neporedne poškodbe dedne snovi).<sup>7</sup> Povečana prisotnost ROS ima za posledico interakcije s številnimi substrati, pri katerih pride do odvzema elektrona, kar vodi do verižne reakcije, vse dokler ni dosežena stabilnost oz. je proces ustavljen. Pri nadaljnji razširitvi poškodb na tkivno raven so pomembni oksidativni mehanizmi kot tudi navzkrižno povezovanje in agregacija proteinov, depolimerizacija hialuronske kisline, cepitev DNK in drugo. Pri tem so radikali večinoma vzrok teh poškodb, včasih pa nastajajo tudi posledično.<sup>1</sup>

**Tabela 2:** Tarče ROS in pripadajoči oksidativni produkti.

Reaktivne zvrsti	Tarčna molekula	Produkti oksidacije
hidroksilni radikal hidroperoksilni radikal	lipidi (PUFA)	lipidni peroksidi, aldehidi, ketoni, alkili
hidroksilni radikal hidroperoksilni radikal	proteini	hidroperoksidi, prečno povezane molekule
hidroksilni radikal hidroperoksilni radikal	hialuronska kislina	glikozidi, hidroperoksidi
hidroksilni radikal	DNK/RNK	8-hidroksigvanin, cepitev, hidroksiliranje, deaminacija

Neposredne posledice učinkovanja ROS v različnih delih celice so:

- povečanje prepustnosti celične membrane,
- peroksidacija biomolekul,
- GSH oksidacija,
- poškodbe DNA,
- tiolna oksidacija proteinov,
- oksidacija piridinskih nukleotidov,
- nepravilnosti pri prenosu dražljajev,
- modifikacija razporeditve citoskeleta,
- nepravilnosti homeostaze ionov,
- inhibicija glikolize,
- izčrpanje NAD<sup>+</sup> in ATP,
- upad/padec mitohondrijskega membranskega potenciala.

V Tabeli 2 so navedeni nekateri najpogostejši produkti, ki nastanejo pri reakciji posameznih radikalov s pomembnimi tarčnimi molekulami v organizmu.

## 2.7 Škodljivi učinki hidroperoksidov

Zelo pogost in pomemben mehanizem, povezan s poškodbami celic in tkiv, je povezan z nastankom hidroperoksidov (R-O-O-H). Hidroperoksidi nastajajo v celici in so za razliko od radikalov bolj stabilni, vendar v celičnem okolju vseeno posedujejo veliko oksidacijsko aktivnost. Tako se ob prisotnosti bakrovih ali železovih ionov zlahka tvorijo alkoksilni in/ali hidroperoksilni radikali. Zaradi toksičnosti jih celice izločajo v biološke tekočine oz. v krvno plazmo. Prisotnost hidroperoksidov v krvni plazmi pa lahko že nakazuje poškodbe tkiva. Hidroperoksidi namreč še vedno izkazujejo dobro oksidacijsko sposobnost, zaradi katere lahko aktivirajo stransko reakcijo ob prisotnosti katalizatorjev v obliki ionov prehodnih kovin, kot je npr. železo. Tako lahko železovi ioni katalizirajo Fentonovo reakcijo nastanka radikalov enako kot v celici. Nastali alkoksilni in/ali hidroperoksilni radikali lahko napadejo lipoproteine, kot je LDL, ali endotelijske celice in povzročijo oksidativne poškodbe.<sup>1</sup>

Najbolj znani hidroperoksid je vodikov peroksid, ki nastaja predvsem kot posledica encimskega odstranjevanja superoksidnega aniona. Ker je zelo podoben vodi, z lahkoto prehaja skozi membrane. Njegova toksičnost se kaže v tem, da je sposoben inaktivirati

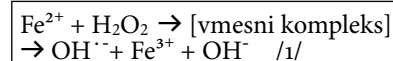
določene encime, hkrati pa ob prisotnosti sledov ionov železa ali bakra razpade na hidroksilni radikal, ki je zmožen sprožiti plaz radikalskih reakcij v celici.<sup>1</sup>

## 2.8 Škodljivi učinki hidroksilnega radikala

Hidroksilni radikal (OH<sup>·</sup>) je v telesu vedno škodljiv in deluje predvsem epigenetično, zlasti če nastane v citoplazmi. V primeru, da nastaja v mitohondriju ali jedru, pa je lahko tudi genotoksičen.<sup>7</sup> Zaradi nezmožnosti potovanja (reagira hitreje od hitrosti difuzije) in izjemne reaktivnosti deluje le lokalno. Njegova škodljivost pa postane pomembna zlasti pri kopičenju železovih ionov v organizmu, ki povečajo nastajanje hidroksilnih radikalov.

Hidroksilni radikal je znan kot eden izmed najreaktivnejših radikalov in lahko nastane pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka, ozona ali pa pri reakcijah, kataliziranih s kovinami.<sup>6-8</sup>

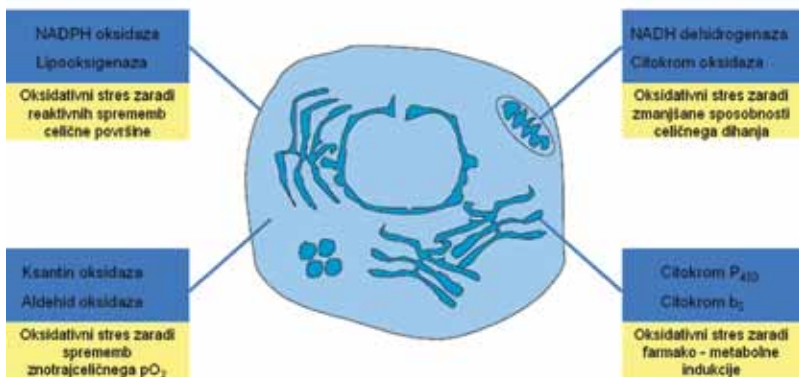
*Fentonova reakcija* je pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala v organizmu. Gre za reakcijo razpada vodikovega peroksida, ki jo katalizirajo železovi ioni.<sup>1,4,7</sup> Kot je prikazano na spodnji reakciji, so tukaj pomembni Fe<sup>2+</sup> ioni, ki preko vmesnega kompleksa povzročijo cepitev vodikovega peroksida na hidroksilni radikal in hidroksilni anion.



Novonastali hidroksilni radikal ponavadi nadalje reagira tako, da pritegne vodikov atom, pri čemer nastane nov radikal in voda.<sup>6</sup> Če ta atom vodika izvira npr. iz molekule maščobne kisline, je to lahko začetek peroksidacije fosfolipidov in nenasičenih maščobnih kislin.<sup>9</sup>

### Peroksidacija biomolekul

Peroksidacija je reakcija, ki ne poteka samo na maščobah, temveč tudi na ostalih organskih molekulah, kot so ogljikovi hidrati, amino kisline, proteini in nukleotidi. Vendar pa so tarčne molekule za napad ROS predvsem membranske polinenasičene maščobne kisline, ki imajo številne razpoložljive protone. Poleg hidroksilnih radikalov



**SLIKA 1:** Celični viri oksidativnega stresa.

lahko peroksidacijo sprožijo tudi alkoksilni in peroksilni radikali.<sup>1</sup>

*Lipidna peroksidacija* poteka po splošni poti radikalne verižne reakcije, ko poljubni radikal reagira z nenasičeno maščobno kislino. Čim bolj je maščobna kislina nenasičena, tem bolj je dovzetna za reakcije z radikali. Prisotne dvojne vezi v molekuli namreč zmanjšajo energijo vodikove vezi na ogljiku, zato se vodik lažje odcepi.

V primeru, da so prisotni sledovi ionov železa, lahko poteče reakcija, pri kateri nastanejo novi hidroksilni radikali, kar še prispeva k širitvi lipidne peroksidacije. Reakcija, pri kateri se peroksidira več tisoč verig maščobnih kislin, lahko sproži že en sam hidroksilni radikal.<sup>6</sup>

Lipidna peroksidacija povzroči poškodbe lipidnega dvosloja celične membrane, kar lahko povzroči spremembo njene propustnosti, izpad funkcije membranskih encimov, motnje prenosa signalov preko transmembranskih receptorskih sistemov in nazadnje propad celične membrane.<sup>12</sup>

### 2.9 Škodljivi učinki superoksidnega aniona (SA)

Superoksidni anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) nastaja endogeno pri celičnih procesih, kjer se porablja kisik. Sem spadajo reakcije porabe kisika v dihalni verigi, fagocitoza, encimske oksidacije, avtooksidacija substratov ter reakcije mikrosomskega prenosa elektronov.<sup>7</sup> Sam SA je slabo reaktiven, je pa zato bolj reaktivna protonirana oblika, ki lahko med drugim povzroči tudi peroksidacijo lipidov.<sup>7</sup>

Celica ga ponavadi nemudoma pretvori s pomočjo superoksid dismutaze (SOD), pri čemer nastane vodikov peroksid in kisik.

Kot vemo, je vodikov peroksid bolj stabilen, vendar je ob prisotnosti ionov prehodnih kovin vseeno nevaren za celico.<sup>6</sup>

### 2.10 Škodljivi učinki kloroaminov

Eni od bolj pomembnih stranskih oksidativnih produktov so tudi kloroamini. Številne študije so pokazale, da respiracijski izbruh aktiviranih fagocitov povzroči *in vivo* in *in vitro* nastanek vodikovega peroksida. Hkrati te celice izločajo hemske encime mieloperoksidazo, ki katalizira reakcijo vodikovega peroksida s fiziološko koncentracijo klorovih ionov. Pri tem pa nastane hipoklorna kislina (HClO), ki je močan oksidant. Hipoklorna kislina igra pri sesalcih pomembno vlogo v boju proti invazivnim mikrobom, saj deluje močno baktericidno. Vendar pa lahko pretirana tvorba HClO povzroči tudi poškodbe tkiv sesalcev, kar je lahko pomembno v povezavi z nekaterimi boleznimi, kot je ateroskleroza, kronične vnetne bolezni in nekatere vrste raka. Številne raziskave so pokazale, da so tarčne molekule HClO proteini, čeprav reagira tudi s številnimi drugimi molekulami, vključno z DNK, lipidi, holesterolom, NADH, prostimi tioli in sulfidi. S pomočjo elektronske spinske resonance so dokazali, da hipoklorna kislina reagira z amino skupinami proteinov, kjer nastanejo kloroamini. Kloroamini pa se lahko nadalje pretvorijo in tvorijo radikale, kot so alkoksilni in/ali peroksilni radikal, ki jih lahko nato zaznamo z omenjeno metodo.<sup>1</sup>

## 3. Povečanje oksidativnega stresa

### 3.1 Dejavniki okolja

V nekaterih primerih so dejavniki okolja primarni vzrok povečane tvorbe ROS. Tako lahko nastopi stanje oksidativnega stresa v neustreznem življenjskem okolju (povečano sevanje, in onesnaženost) ali pri neprimeren načinu življenja (slabo prehranjevanje, pitje alkohola, kajenje, neustrezna telesna dejavnost). K temu dodatno prispevajo tudi psihološki dejavniki (psiho-emocionalni stres), morebitne bolezni (poškodbe, okužbe, krvo-žilne bolezni, maligne bolezni) ter

iatrogeni dejavniki (zdravila, radioterapija, rentgenski in UV-žarki).

#### a) Fizikalni dejavniki

Fizikalni dejavniki vključujejo ionizirajoče in UV-sevanje, ki povzročita cepitev molekul vode oz. preko radiolize ali fotolize. Posledica je nastanek dveh radikalov, hidroksilnega in vodikovega. Človeški organizem se večinoma sestoji iz vode, hkrati pa smo ves čas bolj ali manj izpostavljeni določeni količini sevanja, zato si lahko predstavljamo, da ta pojav tvorbe ROS ni zanemarljiv.

#### b) Kemijski dejavniki

Kemijski dejavnik, ki je sposoben aktivirati proizvodnjo radikalov, je lahko ozon, ki preko delovanja na fenolove derivate neposredno tvori peroksilne radikale. Medtem ko imata sevanje in ozon neposredni učinek na nastajanje radikalov, nekatere kemikalije delujejo posredno, kot so npr. aromatski policiklični ogljikovodiki ter nekatere učinkovine, ki stimulirajo citokrom P<sub>450</sub>.

#### c) Biološki dejavniki

Biološki dejavniki, ki večajo tvorbo ROS, so bakterije in ostali povzročitelji okužb, in sicer preko fizioloških obrambnih mehanizmov pred okužbami ter preko protiteles v imunološkem odgovoru. V teh primerih gre za neposredno delovanje že prej omenjenih zrelih nevtrofilcev na celične membrane. Zreli nevtrofilci namreč vsebujejo številne encimske sisteme, ki so neposredno povezani s tvorbo ter delno tudi z deaktiviranjem ROS. Nenazadnje je bilo ugotovljeno, da lahko pride do povečane tvorbe radikalov v določenih fizioloških primerih, kot npr. pri nosečnosti, intenzivnem mišičnem naporu ali med mnogimi boleznimi.

### 3.2 Spremembe metabolizma

Oksidativni stres lahko torej nastane tudi kot posledica spremenjenega metabolizma, ki se lahko pojavi pri različnih bolezenskih stanjih. Pri tem pa je težko opredeliti, ali so ROS vzrok ali posledica določenih bolezni. Tako lahko na primer radikali povzročijo primarno poškodbo, katere posledice so vidne v spremenjeni celični presnovi, kar pa lahko povzroči nadaljnje sproščanje sekundarnih radikalov. Glede na primarno mesto

generiranja ROS v celici lahko natančneje opredelimo vrsto oksidativnega stresa.

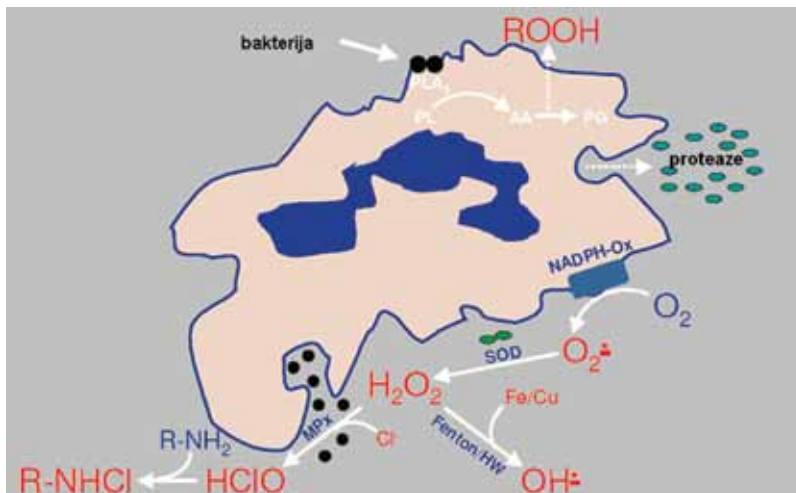
Shema, prikazana na Sliki 1, predstavlja poenostavljeno stanje. Biokemična situacija v celicah in tkivih je mnogo bolj kompleksna, saj so mnogi mehanizmi hkrati vključeni v oksidativne tkivne poškodbe. Zato je pomembno, da poudarimo vzrok oksidativnega stresa, saj le-ta pogojuje različne vrste ROS glede na njihovo mesto nastanka. Prav tako pa njihovi učinki izkazujejo različne značilnosti, kar je odvisno od specifičnega dražljaja.

*Oksidativni stres, povezan z reaktivnimi spremembami celične površine*, nastane zaradi aktivacije plazmaleme, kjer se nahajajo številni encimski sistemi, ki so sposobni tvoriti ROS. Aktiviranje poteka preko nevtrofilcev in jo lahko izzovejo bakterije, endotoksini in imunski kompleksi. Ti dejavniki so se sposobni povezati s površino celične membrane in povzročiti aktiviranje NADPH-oksidade, kar ima za posledico tvorbo superoksidnega aniona. Aktivacija nevtrofilskega-membransko lipooksigenaznega sistema pa je sposobna tvoriti ROS preko produkcije hidroperoksidov.

*Oksidativni stres zaradi zmanjšane sposobnosti celičnega dihanja* nastane zaradi napake v delovanju mitohondrijev, kar ima za posledico presežno tvorbo ROS. To stanje je povezano s povečano metabolno dejavnostjo, ki lahko nastane po naporni telesni dejavnosti ali pri povečanemu hranjenju, in sicer preko povečane tvorbe superoksidnih anionov.

Presežna količina ROS lahko nastane zaradi primarne poškodbe mitohondrijev ali zaradi aktiviranja »začaranega kroga« (metabolna aktivacija → tvorba ROS zaradi elektronskega premika → disfunkcija mitohondrijev → nadaljnja tvorba ROS zaradi elektronskega premika).

*Oksidativni stres zaradi farmako-metabolne indukcije* je povezan z aktiviranjem citokrom P<sub>450</sub> hidroksilacijskega sistema, ki ima funkcijo razstrupljanja. Ta vrsta stresa je primarno povezana z zlorabo alkohola in povečanim izpostavljanjem ksenobiotikom. V teh pogojih lahko opazujemo različne reaktivne vrste, kot je npr. radikal acetamino-



**Slika 2:** Tvorba ROS v različnih delih celice.

fena (paracetamola), ki je pogosta sestavina analgetikov.

Oksidativni stres zaradi sprememb v znotrajceličnem tlaku kisika ( $pO_2$ ) je povezan z ishemično-reperfuzijskimi poškodbami, kar je opazno pri srčnem infarktu, med operacijo srčnega obkroga ter po presaditvi organov. V teh pogojih igra pomembno vlogo aktiviranje ksantin oksidaze, ki je odgovorna za nastanek vodikovega peroksida in superoksidnega aniona.

Slika 2 prikazuje nastajanje različnih reaktivnih kisikovih vrst (označenih z rdečo) v različnih delih celice, pri čemer so reakcije nastanka ROS med seboj povezane.

### 3.3 Zmanjšanje antioksidantne zaščite

Pomemben vzrok za povečanje oksidativnega stresa je lahko tudi neustrezno delovanje antioksidativnega sistema. Zmanjšanje antioksidantne zaščite je lahko posledica zmanjšane vnosa, sinteze ali biološke razpoložljivosti antioksidantov (AO). V tem kontekstu lahko nekatere bolezni, kot je npr. celiakija, povzročijo povečanje oksidativnega stresa zaradi zmanjšane razpoložljivosti zaužitih antioksidantov. Prav lahko pa so vzroki tudi sledeči:

- zmanjšan vnos AO: hipovitaminoza, monotona prehrana;
- zmanjšana absorpcija AO: malabsorpcija, celiakija;
- zmanjšana biološka uporabnost AO: nezadosten prevzem ali prenos;

- oslabitev antioksidativnih encimov: genetski in iatrogeni dejavniki;
- pretirano uživanje AO: prooksidativni učinek antioksidantov;
- povečano uživanje zdravil: preobremenitev mikrosomalnega sistema.

## 4. Posledice povečanega oksidativnega stresa

Posledice povečanega oksidativnega stresa v človeškem organizmu imajo lahko izjemne razsežnosti. Pri tem je ključni problem, da postanejo vidne šele ob izbruhu različnih bolezni, ki imajo vzrok ali posledice v nastajanju radikalov. Izkazalo se je, da so le-ti vpleteni v patogenezo velikega števila različnih bolezni. Čeprav je ponekod prisotnost ROS šele drugotnega pomena, to vsekakor ni zanemarljivo, saj, ko enkrat nastanejo, lahko povzročijo številne verižne reakcije, ki poškodujejo celice in tkiva. Natančno število bolezni, povezanih z oksidativnim stresom, je težko določljivo, mednje pa prav gotovo sodijo današnje civilizacijske bolezni, kot so srčno-žilne bolezni, presnovne bolezni, rak, neurodegenerativne bolezni in ne nazadnje tudi pospešeno staranje.

### 4.1 Pospešeno staranje

Glede procesa staranja so razvili že mnoge hipoteze, ki naj bi razjasnile ta zapleteni fiziološki proces. Ena od teh je tudi hipoteza o spremembi proteinov (nenormalna sinteza, posttranslacijske spremembe...) ter hipoteza o spremembi DNK, ki onemogoča celici, da si opomore po oksidativnih poškodbah in tako pospeši proces staranja. V vsakem primeru igra pri tem genetska zasnova zelo pomembno vlogo, pri tem pa je potrebno upoštevati še druge kofaktorje, kot so npr. čezmerna telesna teža, prevelik vnos hrane in neredna telesna dejavnost. Po drugi strani pa so vsi ti dejavniki nekako povezani s tvorbo radikalov.

Za čezmerno telesno težo se je izkazalo, da spremeni redoksnoravnesje v organizmu, medtem ko zmanjšan kalorični vnos in redna telesna vadba uravnava raven ROS. Poskusi na laboratorijskih živalih so pokazali, da zmanjšanje kaloričnega vnosa



podaljšuje življenjsko dobo in zmanjšuje smrtnost, zlasti tisto, ki je posledica srčno-žilnih bolezni ter raka. Ta pojav je verjetno povezan z zmanjšano tvorbo radikalov v mitohondrijih ter povečanim antioksidativnim obrambnim sistemom. Po drugi strani pa so pri debelosti opazili povečane vrednosti serumskih hidroperoksidov.

Za starejše ljudi je značilna zmanjšana celokupna energijska poraba, predvsem zaradi zmanjšane telesne dejavnosti in znižane stopnje bazalne presnove. Vendar pa ni opaziti zmanjšanja termičnega učinka hrane, ki je neposredno povezano s porabo kisika in nastankom radikalov. Hkrati je pri starejših opazno zmanjšanje čiste telesne mase na račun povečanja maščobne mase. Za ta pojav sta predvsem odgovorna manjša telesna dejavnost in zmanjšano izločanje rastnega hormona. Zato lahko starejši s povečanjem telesne dejavnosti normalizirajo telesno maso in prispevajo k zmanjšanju umrljivosti, povezane s srčno-žilnimi boleznimi.

Zaključimo lahko, da z nadzorom telesne teže, ustrezno telesno dejavnostjo in zmernim kaloričnim vnosom neposredno vplivamo na oksidacijsko stanje v organizmu, posredno pa tudi na hitrost staranja in življenjsko dobo.

## 4.2 Srčno-žilne bolezni

Znano je, da so srčno-žilne bolezni glavni vzrok smrti v zahodnem svetu. Pomembno vlogo igra pri tem zlasti ateroskleroza, zaradi neposredne povezave s patogenezo kapi in srčnega infarkta. Gre za sistemsko bolezen, ki vpliva na debeljenje notranje stene arterij, pri čemer igrajo preko oksidacije lipoproteinov majhne gostote (LDL) pomembno vlogo predvsem radikali. Proces se sproži v endotelu arterijske stene, v gladkih mišičnih vlaknih in v makrofagih. Oksidacija LDL vodi do cepitve polinenasičenih maščobnih kislin ter konjugacije njihovih komponent s fosfolipidi in apoproteinom B. Fragmentiranje in strukturne spremembe tega proteina povzročita prepoznavanje receptorjev makrofagov oz. monocitov, ki ga nato fagocitirajo. Na žalost pa izražanje teh receptorjev nima regula-

cijskega mehanizma, zato lahko prihaja do pospešenega kopičenja oksidiranega LDL v makrofagih, ki se nato spremenijo v penaste celice.<sup>1</sup> Te pa lahko povzročijo poškodbe endotela, preko agregacija trombocitov in sproščanja potencialnih mitogenov. Poleg tega je oksidirani LDL bolj aterogen kot normalen LDL.<sup>10</sup> Oksidirani LDL ima namreč citotoksične lastnosti, inducira izražanje adhezivnih molekul, pospeši tvorbo kemotoksičnih sestavin, inhibira endotelno odvisne sproščujoče faktorje, kot je NO, poveča izražanje tkivnih faktorjev, aktivira trombocite in T-celice, stimulira rast gladkih mišičnih celic ter inhibitorja plazminogenskega aktivatorja ter na splošno poveča imunski odziv.

## 4.3 Sladkorna bolezen

Sladkorna bolezen tipa 2 predstavlja samo vrh ledene gore številnih drugih kroničnih presnovnih bolezni, ki lahko povzročijo različne poškodbe na tkivih in organih. Pravočasna diagnoza skupaj z ustreznim zdravljenjem lahko prepreči bolniku nadaljnje zdravstvene zaplete in mu omogoči normalno življenje.

Vloga radikalov je bila dokazana v patogenezi sladkorne bolezni tipa 2, kroničnem in progresivnem sindromu, značilnem za odrasle in starejše ter sekundarno pri kombinaciji inzulinske rezistence skupaj z odpovedjo beta-celic pankreasa v povezavi z genetskimi in pridobljenimi dejavniki. Sladkorna bolezen tipa 2 je stanje, ki nastane tudi zaradi nesorazmerja med pro- in antioksidantnimi dejavniki. Pravzaprav je takšno stanje posledica hiperglikemije in inzulinske rezistence in jasno ponazarja stanje oksidativnega stresa. Radikali onemogočajo delovanje inzulina, kar vodi v hiperglikemijo. Hiperglikemija in inzulinska rezistenca pa neposredno vplivata na oksidativni stres, najprej preko zmanjšanja učinkovitosti antioksidativne obrambe organizma in nato še s povečanjem krvnih vrednosti radikalov.

Hiperglikemija vpliva na povečanje radikalov preko treh mehanizmov: neencimske glikacije, glukoze avtooksidacije ter poliolske aktivacije v celici. Avtooksidacija glukoze ima za posledico neposreden nastanek radikalov in drugih oksidantov. Poleg tega lahko

glukoza reagira s prehodnimi kovinami tudi v neznatnih količinah, kar zopet sproži nastanek ROS. Neencimska glikacija glukoze z različnimi molekulami ima za posledico številne stranske glikacijske produkte, katerih nastanek pospešujejo radikali, njihovo kopičenje pa je povezano z mikrovaskularnimi poškodbami v kritičnih organih. Poliolna aktiviranja pa nastane zaradi povečane koncentracije glukoze v celici, ker je zaradi pomanjkanja inzulina zmanjšana razgradnja glukoze preko glikolize. Tako v celici pride do aktiviranja ustreznih encimov, ki pretvorijo glukozo v sorbitol in nadalje v fruktozo. Posledica tega je povečana razpoložljivost NADH, aktivira encim prostaglandin hidroperoksidazo in povzroči nastanek superoksidnega aniona.

Inzulinska rezistenca naj bi bila striktno povezana z lipidno peroksidacijo vsaj pri živalskih modelih. To lahko prizadene nekatere organe, zlasti jetra in skeletne mišice. Tako je na primer v kulturah adipocitov inzulin sposoben povečati tvorbo vodikovega peroksida, le-ta pa naj bi posnemal delovanje inzulina. Prav tako je dodatek vanadija povzročil inzulinu podobno delovanje, kar je bilo opazno tudi preko povečanega nastajanja radikalov v celicah. Po drugi strani pa hiperinzulinemija *in vivo* povzroči tudi znižanje koncentracije vitamina E, ki je pomemben antioksidant. Ti izsledki nakazujejo, da povišana raven inzulina, ki je značilna

za inzulinsko rezistenco, lahko poveča oksidativni stres v organizmu.<sup>1</sup>

#### 4.4 Kancerogene bolezni

Reaktivne kisikove zvrsti so neposredno povezane s kancerogenezo in zlasti z rakavimi boleznimi, ki so posledica ionizirajočega sevanja, izpostavljanja ksenobiotikom in škodljivim kemikalijam. Karcinogene dejavnike delimo v grobem na endogene (dedni material, spol, starost ...) in eksogene (organske in anorganske snovi ter ionizirajoče in neionizirajoče sevanje).<sup>6</sup> Večina karcinogenih kemikalij učinkujejo preko tvorbe radikalov, medtem ko nekatere alkilirajoče snovi povzročajo neposredne mutacije dednega materiala. Kot vemo, sta UV in ionizirajoče sevanje odgovorna za fotolizo oz. radiolizo vode, pri čemer nastaja škodljivi hidroksilni radikal.<sup>1,6</sup> Skupaj z ostalimi ROS lahko ta izjemno škodljivi radikal povzroči cepitev dvojne vijačnice DNK ali oksidacijo njenih nukleotidov. To vodi do nastanka hidroksigvanozina, ki je pomemben kazalec oksidativnega stresa.

**Tabela 3:** Najpomembnejši antioksidanti in njihova razdelitev glede na izvor in kemijsko strukturo.

	Neencimski antioksidanti	Encimski antioksidanti
Endogeni	glutation GSH	superoksidna dismutaza
	sečna kislina	glutation peroksidaza
	ubikvinon Q <sub>10</sub>	glutation-S-transferaza
	bilirubin	glutation reduktaza
	melatonin	katalaza
	melanin	
	transferin	
Eksogeni	laktoferin	
	vitamin E (tokoferol)	
	vitamin C (askorbinska kislina)	
	β-karoten	

## 5. Uravnavanje oksidativnega stresa

### 5.1 Vrste antioksidativnih sistemov

Zdrav organizem je sposoben preprečiti škodljivo delovanje radikalov. V telesu namreč obstaja naravni obrambni sistem, ki ga sestavljajo različni encimski sistemi in ostale snovi pod skupnim imenom antioksidanti.

Poznamo več obrambnih mehanizmov: primarni, sekundarni in terciarni. Pri primarnem obrambnem mehanizmu gre za preprečevanje nastanka radikalov. Sekundarni mehanizmi nevtralizirajo radikale, terciarni pa poskrbijo za popravilo morebitnih poškodb zaradi delovanja radikalov.

V antioksidativni obrambni sistem prištevamo vse molekule in spojine, ki so sposobne nevtralizirati radikale, preprečiti njihov nastanek ali jih katalitično odstraniti. Sam sistem je običajno porazdeljen znotraj organizma na znotraj- ali zunajcelični ravni. V zunajceličnem prostoru in v krvni plazmi predstavljajo antioksidantno plazemsko pregrado vse snovi, ki imajo redukcijske sposobnosti za nasičenje elektronskega primanjkljaja. Sem spadajo glutacion, tioli, albumini, bilirubin, sečna kislina, holesterol ter eksogene snovi, kot so askorbinska kislina, tokoferoli, polifenoli, bioflavonoidi. V

tem kontekstu igrajo pomembno vlogo tiolove spojine, ki predstavljajo dobre »ponudnike« vodika.<sup>1</sup>

Znotraj celice je antioksidantni sistem dobro razporejen v številnih delih celice. Vendar pa glavna radikalov nastane v lipidnih plasteh, kjer se nahajajo encimi, potrebni za katalizo radikalnih reakcij, zato so lipofilni antioksidanti v bioloških membranah prva obrambna črta pred delovanjem ROS. Kasnejšo obrambno črto pa zastopajo vodotopni vitamini, kot je vitamin C in nekateri vitamini skupine B.

### 5.2 Antioksidanti (AO)

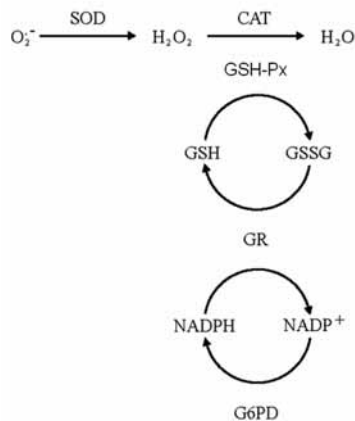
Po definiciji so antioksidanti snovi, ki znatno upočasnijo ali preprečijo oksidacijo pomembnih celičnih sestavin, tako da reagirajo z radikali in zaustavijo verižne radikalne reakcije.<sup>5</sup> Lastnost teh snovi je, da imajo v svoji strukturi vsaj en reaktiven vodik, ki se zlahka odcepi in veže na radikal. Pri tem nastane nov radikal, ki je stabilnejši in zato tudi manj škodljiv. Drugače pa gre pri antioksidantih za zelo heterogeno skupino molekul, ki delujejo preko različnih mehanizmov.

Glede na izvor ločimo endogene antioksidante kot npr. encimski sistemi superoksidne dismutaze in katalaze ter snovi, katere dodatno vnašamo v organizem z

**Tabela 4:** Pomembnejši antioksidanti in njihov mehanizem delovanja.

Razred	Antioksidant	Mehanizem delovanja
Sekvestrorji kovin	transferin, laktoferin	Kelacija železa.
	albumini	Kelacija bakra.
Katalitično odstranjevanje ROS	superoksid dismutaza	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	katalaza	Disproporcionira vodikov peroksid $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
	glutacion peroksidaza	Reducira $H_2O_2$ in ostale hidroperokside $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GS-SG$ .
	glutacion-S-transferaza	Cepi lipidne perokside.
Lovilci radikalov	vitamin E (tokoferol)	Nevtralizira radikale.
	vitamin C (askorbinska k.)	Reagira neposredno z $O_2^{\cdot -}$ in $OH^{\cdot}$ , nevtralizira ROS.
	$\beta$ -karoten	Lovilec $^1O_2$ , reagira tudi s peroksilnimi radikali.
	glutacion GSH	Lovilec $OH^{\cdot}$ in $^1O_2$ , reducira organske perokside.

**Slika 3:** Shema poteka reakcij glutation redoksnega sistema. Obrazložitev oznak: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR), glutation (GSH), oksidirana oblika glutationa (GSSG – dimerna oblika), G6PD (glukoza-6-P-dehidrogenaza)



ustrezno prehrano, npr. vitamine.<sup>5</sup> Glede na kemijsko strukturo se antioksidanti delijo na encimske ter ne-encimske snovi ter glede na topnost na hidrofilne in hidrofobne. Hidrofilni reagirajo z oksidanti predvsem v citosolu in krvni plazmi, medtem ko hidrofobni preprečujejo lipidno peroksidacijo celičnih membran.

Pomembni načini delovanja antioksidantov:

- katalitično odstranjevanje radikalov in drugih ROS (superoksidna dismutaza, katalaza, peroksidaza ...);
- glutation, askorbinska kislina,  $\beta$ -karoten in podobne nizko molekularne snovi so t.i. lovilci radikalov, ki delujejo tako, da reagirajo z radikali, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem pridobijo lastnosti radikalov;
- nekateri proteini (transferini, hemopeksini, haptoglobini) reagirajo s prooksidanti (železovi, bakrovi ioni, hem) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter tako preprečijo nastanek predvsem hidrokislnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov.

Delovanje antioksidantov lahko tako v grobem ločimo na preprečevalno in zdravilno. Pri prvem gre predvsem za preprečevanje nastajanja radikalov in oksidativnih poškodb. V primeru, da do poškodb vendarle pride, se vključijo t.i. popravljalni mehanizmi. Ti vključujejo encime, ki posredujejo šele po nastanku poškodb z ROS. Njihovo delovanje, ki je pogosto zaporedno, najprej vključuje identifikacijo, nato odstranitev oksidirane molekule ter končno sintezo novega dela, ki ga vključijo nazaj v po-

škodovano molekulo. Sem spadajo hidrolaze (glikozidaze, lipaze, proteaze), transferaze in polimeraze.<sup>1,5</sup>

## 6. Encimski antioksidanti

### 6.1 Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaze spadajo v skupino metaloencimov, ki katalizirajo reakcije dismutacije superoksidnega radikala v molekulo vodikovega peroksida in kisika. Glede na prostetične skupine ločimo tri različne SOD, in sicer imajo prve v aktivnem središču cink in baker, druge železo in spet tretje mangan. Njihova aktivnost se razlikuje od tkiva do tkiva in je največja v jetrih, ledvicah in vranici.<sup>10</sup>

### 6.2 Glutation redoksn sistem

Sam sistem sestavljata encima glutation peroksidaza (GSH-Px) in glutation reduktaza (GR) ter njun substrat, glutation (GSH) (Slika 3). Encima katalizirata redukcijo vodikovega peroksida ali organskih peroksidov do vode, pri čemer pride do oksidacije glutationa, ki se pri tem pretvori v dimerno obliko (GSSG). Sledi regeneracija reducirane oblike glutationa, ki jo katalizira glutation reduktaza. Pri tej reakciji kot vir energije služi oksidacija NADPH.

Glutation peroksidaza je v celičnem citosolu in matriksu mitohondrijev. Poznamo dve različni obliki GSH-Px in sicer od selena odvisno in od selena neodvisno. Prve lahko reducirajo tako vodikov peroksid kakor tudi organske perokside, slednje pa le vodikov peroksid.

Glutation reduktaza se prav tako nahaja v citosolu, vendar ni neposredno povezana z odstranjevanjem ROS. Igra pa pomembno vlogo pri regeneraciji GSH, s čimer zagotavlja nemoteno katalitično delovanje glutation peroksidaze.<sup>10</sup>

### 6.3 Katalaza (CAT)

Katalaze so hemoproteini, ki odstranjujejo vodikov peroksid in s tem preprečujejo nastanek hidrokislnega radikala. Nahajajo se predvsem v peroksisomih. Katalaze naj-

demo v različnih tkivih, najbolj aktivne pa so v jetrih, eritrocitih in ledvicah.<sup>10</sup>

#### 6.4 Tioredoksin in tioredoksin reduktaza

Dodatni encimski antioksidativni in redoksní sistem tvorita skupaj tioredoksin in tioredoksin reduktaza, ki sta vključena v številne procese, povezane z nastankom ROS. Njuna ključna vloga je predvsem pri regeneraciji mnogih antioksidantnih molekul, kot so npr. ubikinon, lipoična ter askorbinska kislina.<sup>11</sup>

#### 6.5 Antioksidanti, ki niso encimi

V to skupino antioksidantov prištevamo predvsem vitamine z antioksidativnim delovanjem, glutation, ostale tiole ter nekatere druge biološke spojine, ki kažejo antioksidativno delovanje (proteini, ubikinon, lipoična kislina...)<sup>10</sup>

##### Askorbinska kislina:

Vitamin C je vodotopen vitamin in eden pomembnejših antioksidantov v zunajcelični tekočini. Uvrščamo ga med lovilce radikalov, saj mu kemijska struktura omogoča, da neposredno reagira s superoksidom, hidroksilnim radikalom in ostalimi peroksidi ter se pri tem oksidira do stabilnega askorbilnega radikala. Najbolj učinkovit je v plazmi, kjer preprečuje nastanek škode na membranah eritrocitov. Regenerira se lahko na dva načina in sicer s pomočjo encimov ali brez njih. V prvem primeru reakcijo katalizirata encima NADH semidehidroaskorbat reduktaza in dehidroaskorbat reduktaza. Pri neencimski regeneraciji pa igrata poveljavno vlogo glutation in lipoična kislina. Pri visokih koncentracijah askorbata in ob prisotnosti prehodnih kovin lahko deluje prooksidativno in tvori reaktivne kisikove spojine, tudi hidroksilni radikal.

##### $\alpha$ -tokoferol (vitamin E):

V naravi se vitamin E nahaja v osmih izomernih oblikah, od katerih je najbolj znan in za človeka pomemben prav  $\alpha$ -tokoferol. Gre za lipofilni vitamin, ki se na celični ravni nahaja predvsem v membranah organelov (mitohondriji in endoplazmatski retikulum) in plazmalemi.

Vitamin E nudi antioksidativno zaščito predvsem polinenasičenim maščobnim kislinam, tako da reagira z radikali in se oksidira do tokoferilnega radikala. Tak radikal se nato inaktivira, tako da se združi še z enim tokoferilnim radikalom ali pa se reducira s pomočjo askorbinske kisline. Še posebej pomemben je v plazmi, kjer preprečuje nastanek poškodb na membranah eritrocitov (10,12).

##### $\beta$ -karoten:

Karotenoidi so heterogena skupina barvnih pigmentov, za katere je značilna dolga alifatska veriga konjugiranih dvojnih vezi, zaradi česar so dobri antioksidanti. Beta karoten je t.i. lovilec singletnega kisika in je odgovoren predvsem za preprečevanje lipidne peroksidacije.

##### Glutation:

Glutation je tripeptid, sestavljen iz cisteina, glicina in glutamata. Skupaj z glutation peroksidazo in glutation reduktazo deluje v okviru prej opisanega glutation redoksnega sistema. Redokсно razmerje med GSH in GSSG je dober kazalnik oksidativnega stresa.<sup>13</sup>

*Proteini*, kot so transferin, laktoferin in feritin, vežejo proste ione prehodnih kovin, jih tako naredijo nedostopne za vstop v radikalne reakcije ter preprečijo nastanek radikalov.

##### Transferin:

Transferin je plazemski glikopeptid, zadolžen za prenos železovega iona po krvi. Vež med transferinom in železom je močna, a reverzibilna. V nebolezenskih razmerah je zasedena največ tretjina molekul transferina, v nasprotnem primeru, če je zasedenost prevelika, pa pride do prooksidativnega delovanja, saj se prično železovi ioni sproščati.

##### Feritin:

Sestavljen je iz 24 polipeptidnih molekul in je ključni znotrajcelični protein za skladiščenje železa. Ena molekula feritina lahko veže tudi do 4500 železovih ionov.

##### Laktoferin:

Laktoferin je globularni protein; v nasprotju s feritinom lahko ena molekula laktoferina veže le dva železova iona. Najdemo

ga v mleku, slini, solzah in ostalih sekrecijskih tekočinah.<sup>14</sup>

## 7. Določanje oksidativnega stresa

Dejansko stanje oksidativnega stresa v organizmu je težko določljivo. Vzrok je v izjemno kratki življenjski dobi radikalov ter njihovi veliki reaktivnosti. Tako pogosto ne moremo neposredno določiti količine primarno nastalih radikalov, temveč le njihove bolj stabilne vmesne presnovke. Poleg tega je organizem živ sistem, ki se neprestano spreminja, zato je vsakršna določitev oksidativnega stresa le približna ocena trenutnega stanja. Zato je določanje parametrov, ki opredeljujejo oksidativno stanje v organizmu, vsekakor koristno.

Merjenje oksidativnega stresa v organizmu ni najbolj preprosto. Reaktivne kisikove zvrsti, ki nastajajo med različnimi oksidacijskimi procesi, so namreč zelo raznolike in spremenljive, zato jih težko zaznamo. Različne metode se lahko nanašajo neposredno na določanje posameznih reaktivnih kisikovih vrst ali pa posredno na merjenje različnih produktov oksidacije. Na voljo je kar nekaj metod, pri tem pa ima seveda vsaka metoda svoje prednosti in slabosti. Pogoste metode za določanje t.i. prooksidantnega statusa so: ESR (elektronska spinska resonanca), d-ROMs test, test TBAR (določanje presnovkov tiobarbiturne kisline kot produktov lipidne peroksidacije), določanje vsebnosti lipoperoksidov, določanje nekaterih stranskih produktov oksidacije (npr. izoprostanov) in kemiluminescenca (pospešena z luminolom), ki je uveljavljena pri merjenju sproščanja radikalov iz nevtrofilcev, ter določanje 8-hidroksi-degvanozina kot kazalnika oksidacije DNA v urinu.<sup>15</sup> V krvi določamo encime, ki so vključeni v zaščito celic: superoksid dizmutazo (SOD), katalazo (CAT), od selena odvisne glutation peroksidaze, izoencime glutation-S-transferaze in glutation reduktazo. Poleg specifičnih parametrov lahko določimo tudi celokupni antioksidantni status (TAS).

## Literatura

1. Eugenio Luigi Iorio, MD, PhD.; FRAS<sub>4</sub> and global assesment of oxidative stress; Presentation of FRAS<sub>4</sub> system, Diacron International s.a.s, Grosseto ,Italy,10.11.2003
2. Zupan M., Zaletel M., Žvan B., Flis V. Perioperativna možganaska kap in aterosklerotične spremembe na zunajlobanjskih možganskih arterijah. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 651–8.
3. Janša K. Povečana debelina intime-medije karotidnih arterij in dejavniki srčno-žilne ogroženosti žensk, ki so imele nosečnostno sladkorno bolezen. *Zdrav Vestn* 2009; 78: 387–92.
4. Šuput D, Kamarič L. Izvor in reakcije radikalov. In: Ribarič S eds. *Izbrana poglavja iz patološke fiziologije*. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 15–24.
5. Pečar S. Antioksidanti. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Prehranska dopolnila – zdravila ali hrana, Podiplomsko strokovno izobraževanje 2001/2002: 97–10497–104
6. Kreft S, Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih. *Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani Farm vestn* 1998; 49: 469–481
7. Šuput D. Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih. In: Ribarič S eds *Izbrana poglavja iz patološke fiziologije*. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 25–36.
8. Mark G, Tauber A, Laupert R, Schuchmann HP, Schulz D, Mues A in Sonntag C. OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution – Part II: Terephthalate and Fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield Original Research Article *Ultrasonics Sonochemistry* 1998; 5: 41–52
9. Žele L.: Značilnosti izmerjenih fizioloških parametrov kolesarjev na modificiranem kolesarskem testu, diplomska naloga, Fakulteta za šport, Ljubljana 2003
10. Ji LL, Leichtweis S.: Exercise and oxidative stress: sources of free radicals an their impact on antioxidant systems. *Age* 1997; 20: 91–106
11. Giordano FJ: Oxigen, oxidative stress, hypoxia and hearth failure. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115 : 500–508
12. Viitala P, Newhouse IJ, LaVoie N, Gottardo C: The effects of antioxidant vitamin suplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids in Health and Disease* 2004; 3: 14.
13. Sonnenborn JS, Barbee SA: Exercise-induced stress response as an adaptive tolerance strategy. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 325–330
14. McArdle A, Patwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson J: Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 621–627
15. Chance B, Gao G: In vivo detection of radicals in biological reactions. *Environmental health perspectives* 1994; 102: 29–32