

ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У БОЛЕСТИМА КОД ЉУДИ

Видосава Б. ЂОРЂЕВИЋ¹, Лилика ЗВЕЗДАНОВИЋ², Владан ЂОСИЋ²

¹Институт за биохемију, Медицински факултет, Универзитет у Нишу, Ниш;

²Центар за медицинску биохемију, Клинички центар Ниш, Ниш

КРАТАК САДРЖАЈ

Оксидациони стрес је „привилегија“ аеробних организама. Могу га изазвати ендогени и екзогени фактори, а одликује се прекомерним стварањем најчешће слободних радикала и нерадикалских производа кисеоника и азота, који се једним именом називају „реактивне врсте“. Оксидациони стрес је штетан процес јер представља важан медијатор оштећења ћелијских структура, укључујући липиде и мембране, протеине и ДНК. Међутим, реактивне врсте кисеоника и азота су производи са два лица. Створени у малим, односно умереним концентрацијама као сигнални молекули, они регулишу разне физиолошке процесе, као што су одбрана од инфекције, одржавање васкуларног тонуса, контролisanje вентилације и стварања еритропоеина и пренос сигнала са мембранских рецептора у различитим физиолошким процесима. Многи одговори до којих доводе реактивне врсте кисеоника штите ћелију од оксидационог стреса и одржавају тзв. редокс-хомеостазу. Тада се обе реактивне врсте стварају помоћу строго регулисаних ензима, као што су азот-моноксид синтаза (NOS) и изоформе NADPH-оксидазе, али и као нежељени споредни производи мање регулисаних извора, као што је респираторни ланац митохондрија. У великим концентрацијама реактивне врсте учествују у патогенези атеросклерозе, кардиоваскуларних болести, хипертензије, исхемијско-реперфузионог оштећења, шећерне болести, неуродегенеративних и имуноинфламаторних болести. Као секундарни носиоци информација у међућелијским сигналним каскадама реактивне врсте могу изазвати онкогени фенотип канцерских ћелија, старење ћелије и апоптозу.

Кључне речи: оксидациони стрес; реактивне врсте кисеоника; реактивне врсте азота; болести код људи

УВОД

Молекулски кисеоник су открили Лавазијер (*Lavoisier*) и Пристли (*Priestly*) 1775. године, описујући га као неопходну, али опасну супстанцу [1]. Године 1954. Гершман (*Gershman*) и сарадници су доказали да токсичност кисеоника потиче од делимично редукованих облика кисеоника [1]. После саопштења Хармана (*Harman*) [2] да су слободни радикали Пандорина кутија зла, почела су интензивна истраживања слободних радикала у биолошким системима. Открићем ензима супероксид-дисмутазе (SOD) 1969. године почиње друга ера у истраживању слободних радикала и спознаја о њиховој важности у биологији [3]. Трећа ера почиње 1977. године, када је доказано да хидроксилни радикал (OH) активира гванилат-циклазу и стварање секундарног носиоца информација cGMP [4]. Истраживања која су следила после открића азот-моноксида 1987. године и реактивних врста азота показала су да живи системи не само да су адаптирани на коезистенцију са слободним радикалима, већ су развили разне механизме за коришћење слободних радикала у различитим физиолошким функцијама [5]. Стога се може рећи да слободни радикали и нерадикалске реактивне врсте имају двојаку природу која је недвосмислено потврђена. Реактивне врсте кисеоника се непрестано стварају у ћелијама које су изложене аеробној средини. Антиоксидациони системи су коеволуирали с аеробним метаболизмом како би спречили оксидационо оштећење помоћу реактивних врста кисеоника.

Реактивне врсте кисеоника и азота се у физиолошким условима стварају током нормалног ћелиј-

ског метаболизма у разним биохемијским реакцијама (Схема 1). За обе врсте је доказано да могу играти двоструку улогу, односно да испољавају корисне и штетне ефекте. Створене у малим, односно умереним концентрацијама, испољавају низ физиолошких улога, као што су одбрана од инфекција, пренос сигнала у ћелијама, индукција митогеног одговора, имунорегулација, неуротрансмисија. Штетни ефекти реактивних врста подразумевају биолошка оштећења која се јављају у условима оксидационог или нитрозативног стреса.

Оксидациони стрес настаје када дође до поремећаја равнотеже између прооксиданса и антиоксиданса, односно до повећаног стварања реактивних врста кисеоника и азота или до недостатка антиоксидационе заштите. Деликатна равнотежа између корисних и штетних ефеката реактивних врста је важан аспект аеробних организама, а остварује се механизмом тзв. редокс-регулације. Овај процес штити организме од оксидационог стреса и одржава редокс-хомеостазу контролом редокс-статуса *in vivo* [6].

РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ КИСЕОНИКА

Супероксид-анјон радикал (O_2^-), који се ствара током процеса метаболизма или активацијом кисеоника зрачењем, представља „примарну“ реактивну врсту кисеоника која може да реагује са другим молекулима, стварајући тзв. секундарне врсте кроз ензимске или реакције катализоване металом [7]. Углавном се ствара у митохондријама ћелија [8]. Између 1% и 3% свих електрона током преноса кроз респираторни

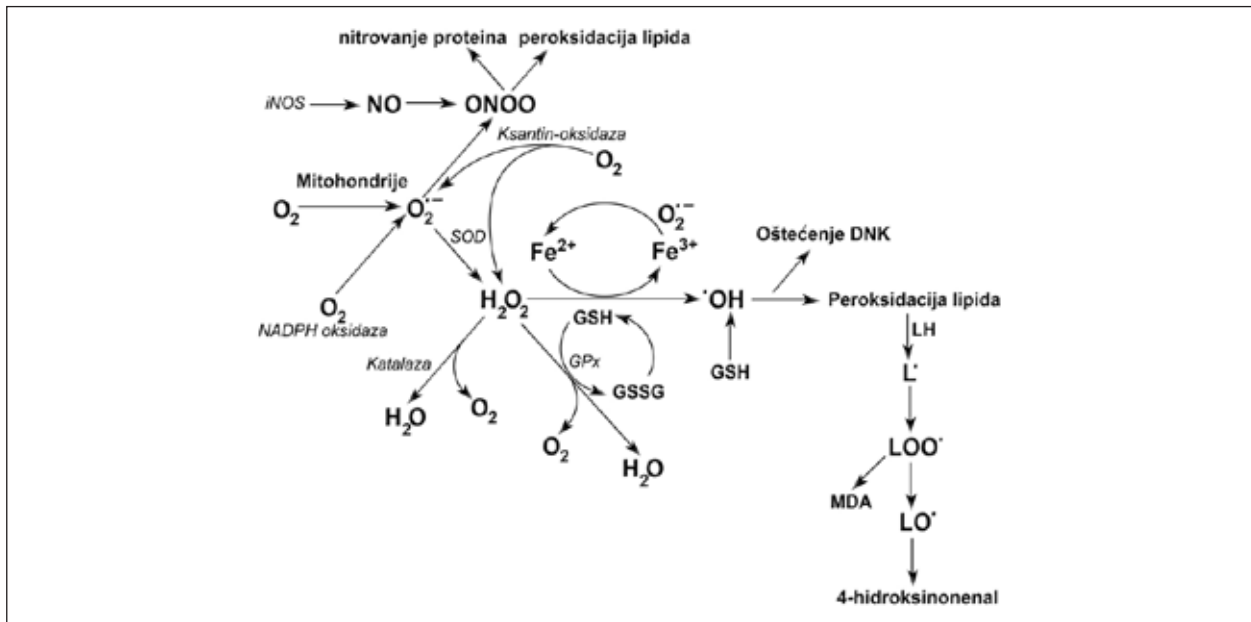


СХЕМА 1. Пuteви стварања реактивних врста (респираторни ланац митохондрија, *NADPH*-оксидаза, *XO*, *iNOS*), механизми њиховог уклањања помоћу антиоксиданса (*SOD*, *GPx*, *CAT*, *GSH*) и директни токсични ефекти оксидационог стреса.

DIAGRAM 1. Formation path of reactive components (respiratory chain of mitochondria, *NADPH* oxidase, *XO*, *iNOS*), mechanism of their elimination by antioxidants (*SOD*, *GPx*, *CAT*, *GSH*) and direct toxic effects of antioxidative stress.

ланац митохондрија „побегне” на молекулски кисеоник, најчешће са комплекса *I* и *III*, стварајући 4-7 *nmol* у минути по *mg* протеина O_2^- [9]. Супероксид-анјон створен на нивоу комплекса *I* ослобађа се у матрик митохондрије [10], а створен на нивоу комплекса *III* ослобађа се ван митохондрије, што одговара приближно половини „изгубљених” електрона.

Други физиолошки процес који ствара значајне количине O_2^- је фагоцитоза. Током активације професионалних фагоцита 90% молекула кисеоника се претвара у O_2^- помоћу ензимског система никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (*NADPH*) оксидазе. Ензимски комплекс се састоји од две мембранске компоненте, *gp91^{phox}* и *p22^{phox}*, које чине цитохром *b558*. После активације хелија долази до транслокације цитозолских компоненти *p47^{phox}*, *p67^{phox}*, *p40^{phox}* и малих ГТП-аза, *Rac* и *Rap1A*, те стварања активног ензимског комплекса. Активацију *NADPH*-оксидазе у неутрофилима контролише *rac2*, а у макрофагима и моноцитима *rac1* [11]. Створени супероксид се дисмутира у H_2O_2 , а њиховом међусобном реакцијом настаје OH ; кад постоји хлор и мијелопероксидаза, H_2O_2 се трансформише у хипохлорну киселину. Све наведене врсте убијају микроорганизме и одстрањују стране и оштећене биомолекуле.

Друге, нефагоцитне, хелије (фибробласти, ендотелне хелије, васкуларне глаткомишићне хелије, миоцити, хелије тироидеје) експримирају изоформе *NADPH*-оксидазе, које стварају 1-10% O_2^- у односу на фагоцитне ензиме, ослобађају O_2^- или H_2O_2 , који учествују у регулацији преноса сигнала у хелији. За *gp91^{phox}* хомолог *p138^{tox}* доказано је да учествује у *NADPH*-оксидазној стимулацији синтезе тироидних хормона [12], док неке друге изоформе делују као сен-

зор за кисеоник у каротидама, што је значајно у контроли вентилације, или као сензори кисеоника у регулацији стварања еритропоетина [6].

Многе оксидазе (посебно ксантин-оксидаза) током каталитичке активности могу да стварају и O_2^- и H_2O_2 . Ослобађање O_2^- врши се помоћу супероксид-дисмутазе (*SOD*); међутим, у киселој средини (фаголизозом) могућа је и спонтана дисмутација у H_2O_2 или у тзв. синглетни кисеоник (1O_2). Водоник-пероксид није слободни радикал, али има изражена оксидациона својства и у довољним концентрацијама може убити било коју хелију. На срећу, у тако високој концентрацији не може да се створи у условима *in vivo*. У физиолошким условима H_2O_2 се у највећој мери ствара у пероксизомима, где се разлаже дејством каталазе, чиме се спречава његово нагомилавање [7]. Када дође до оштећења пероксизома, H_2O_2 се ослобађа у цитозол, где значајно доприноси развоју оксидационог стреса. Токсичност H_2O_2 се повећава стварањем хипохлорне киселине (*HOCl*) и 1O_2 у реакцији коју катализује мијелопероксидаза фагоцита. Такође, у Хабер-Вајсовој (*Haber-Weiss*) реакцији концентрација H_2O_2 се директно смањује супероксидом уз стварање хидроксилног радикала OH [13]. Уз постојање слободних метала са променљивом валенцом токсичност концентрација H_2O_2 може да се повећа до хиљаду пута.

Хидроксилни радикал са полуживотом од око 10^{-9} секунди је најреактивнији слободни радикал, који након стварања практично реагује са првим биомолекулом у свом окружењу, због чега је врло токсичан. Настаје у условима оксидационог стреса када створени O_2^- ослобађа „слободно гвожђе” из молекула који га садрже, као што су ензими који садрже гвожђе, у гвожђе-сумпор (*4Fe-4S*) кластерима [14]. Ослобођено

двовалентно гвожђе може ући у Фентонову реакцију, којом се ствара OH ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH$) [13]. Настало тровалентно гвожђе надаље може реаговати са O_2^- регенеришући Fe^{2+} за нову Фентонову реакцију ($Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$). У којој мери је ова реакција могућа у физиолошким условима – још није јасно. Сматра се да и гвожђе из слободног пула може да се укључи у Фентонову реакцију. Гвожђе се иначе налази у протеинима који га везују (трансферин, феритин, хемосидерин), па га у слободном пулу има у веома малим концентрацијама. Међутим, у организмима који су оптерећени гвожђем, као што су хемохроматоза, бета-таласемија и хемодијализа, повећава се пул слободног гвожђа, те оно може испољити токсичне ефекте. Регулација концентрације гвожђа остварује се преко кластера гвожђе–сумпор *IRE-BP* (енгл. *iron-responsive element-binding protein*), чију функцију модификује концентрација гвожђа у ћелији, чиме се мења способност *IRE-BP* да реагује с елементима који одговарају на постојање гвожђа (енгл. *iron-responsive elements – IREs*) [15].

Током процеса липидне пероксидације, који, у ствари, представља оксидацију полинезасићених масних киселина у биолошким мембранама, коју могу иницирати OH , 1O_2 , перхидроксилни радикал и тиоли, стварају се други кисеоникови радикали: пероксил, хидропероксил, алкил и алкоксил. Овај процес разграђује масне киселине и доводи до ослобађања испарљивих кратколанчаних угљоводоника алкана и алкена и реактивног малондиалдехида (*MDA*).

РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ АЗОТА

Азот-моноксид (*NO*) је најмањи слободни радикал који је овечао своје проналазаче Нобеловом наградом, а 1992. године проглашен је „молекулом године” у часопису *Science*. У ћелијама се синтетиче из аминокиселине *L*-аргинина дејством ензима азот-моноксид синтазе (*NOS*), која се експримира у три изоформе, од којих су две конститутивне (*nNOS-NOS1* и *eNOS-NOS3*), чија се активност регулише концентрацијом калцијума унутар ћелије, а једна индуцибилна (*iNOS-NOS2*), која се ствара дејством цитокина, липополисахарида и других агенаса. Молекул *NO* је растворљив и у воденим и у масним медијумима, па лако може дифундовати кроз цитоплазму и мембране плазме. У физиолошким условима учествује у регулацији бројних процеса, као што су неуротрансмисија, крвни притисак, одбрамбени механизми, релаксација глатких мишића, инхибиција адхезије тромбоцита и имунорегулација [16]. Већину ефеката *NO* остварује иницијалним везивањем за гвожђе-хемоглобин-циклазе. Код прекомерног стварања *NO*, које је најчешће удружено с оксидационим стресом, настаје нитрозативни стрес праћен стварањем низа реактивних врста, од којих је најтоксичнији пероксинитрит, произведен у реакцији *NO* и O_2^- . Нитроза-

тивни стрес доводи до нитрозијације протеина, уз последични губитак њихове нормалне функције, до фрагментације ДНК и оксидације липида [17]. Реактивне врсте азота инхибирају аконитазу разградњом кластера гвожђе–сумпор, али истовремено ослобађају РНК-везујуће место специфично за *IREs* трансферинског рецептора и информациону РНК (иРНК) за феритин [6]. У овом облику протеин се зове *IRP-1* (енгл. *iron regulatory protein-1*) и регулише хомеостазу гвожђа. На овај начин реактивне врсте азота доводе до губитка једне функције (ензимске), а успостављања друге функције истог протеина. Експресија *iNOS* је регулисана на транскрипционом и посттранскрипционом нивоу сигналним путевима, као што су редокс-респонзивни транскрипциони фактор *NF-κB* или киназе протеина активисане митогеном (*MAPK*) [18]. У извесној мери синтеза *NO* зависи и од постојања супстрата *L*-аргинина или кофактора тетрахиодриоптерина (*BH4*).

АНТИОКСИДАНСИ

Аеробни организми су током еволуције створили низ антиоксидационих механизма који их штите од токсичног дејства слободних радикала и нерадикалских врста. Ензимски антиоксидациони систем обухвата: 1) супероксид-дисмутазу (*SOD*), која дисмутира O_2^- у H_2O_2 ; 2) глутатион-пероксидазу (*GPx*), која разлаже H_2O_2 и органске хидропероксиде; и 3) каталазу (*CAT*), која разлаже H_2O_2 . Бројни су и неензимски антиоксиданси: витамин *C*, витамин *E*, глутатион, каротиноиди, флавоноиди и састојци крвне плазме [19]. Нормално постоји равнотежа између активности и количине антиоксиданса у ћелији, чиме се њихов ниво одржава на нивоу за обављање физиолошких функција, што је значајно за живот и здравље аероба. Најзначајнији у одржавању редокс стања у ћелијама јесте трипептид-глутатион (*GSH*) [20], који се у великој концентрацији налази у цитозолу (1-11 *mmol*), једру (3-15 *mmol*) и митохондријама (5-11 *mmol*). Пренос из цитозола, где се синтетиче, у митохондрије врши се посредством дикарбоксиланог носећег протеина и 2-оксоглутарат носећег протеина. Однос његовог редукованог и оксиданог облика (*GSH/GSSG*) валидан је параметар процене оксидационог стреса у организму [21]. Заштитна улога *GSH* остварује се преко кофакторске улоге *GPx* и глутатион-трансферазе, директним скевенцирањем радикала *HO* и 1O_2 , односно регенерацијом антиоксидационих витамина. У условима оксидационог стреса долази до оксидације *GSH* и смањења његове концентрације, али и до значајних поремећаја активности антиоксидационих ензима [22]. Дистрибуција антиоксидационих ензима у ткивима није униформна. Нека ткива (ћелије ендокриног панкреаса) садрже релативно мале количине ових ензима, што их чини посебно осетљивим на оксидациони стрес.

ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС У НАСТАНКУ БОЛЕСТИ

Оксидациони стрес је један од патогенетских механизма у разним болестима код људи које се могу сврстати у две категорије. Прва се може дефинисати као „запаљењско оксидационо стање”, које је удружено с прекомерном стимулацијом *NADPH*-оксидазе цитокинима или другим агенсима. У том случају повећање реактивних врста кисеоника или промене нивоа глутатиона у ћелији прате патолошке промене које указују на нерегулацију сигналних каскада, односно експресије гена. Друга категорија (дијабетес, канцер) испољава прооксидациона обележја у виду промене тиол-дисулфидног редокс-стања и поремећаја клиренса гликозе, што указује на то да митохондрије скелетних мишића могу бити главно место стварања реактивних врста кисеоника (тзв. митохондријални оксидациони стрес).

АТЕРОСКЛЕРОЗА И КАРДИОВАСКУЛАРНЕ БОЛЕСТИ

Атеросклероза је хронична запаљењска болест на чији настанак и напредовање делује велики број фактора ризика (хиперлипидемија, дијабетес, хипертензија). Одликује је ексцесивно стварање реактивних врста кисеоника у ткивима васкуларног зида активацијом изоформи *NADPH*-оксидазе, ксантин-оксидазе, липооксигеназе, циклооксигеназе, као и анкуплованим механизмом *eNOS* и повећаним стварањем у митохондријама [23]. У атеросклерозном зиду крвног суда доказан је повећан садржај O_2 , H_2O_2 , *OH* и липидних пероксида (*LOOH*). Најновији подаци показују да у развоју атеросклерозе значајну улогу има тзв. *heat shock* протеин *hsp60*, који, када се прекомерно ствара, може да се створи на ћелијској мембрани и да стимулише аутоимуноу реакцију [24].

Један од најранијих догађаја у атеросклерози је инфилтрација артеријског зида моноцитима и *T*-лимфоцитима. Моноцити се диференцирају у макрофаге који експримирају *NADPH*-оксидазу (ствара слободне радикале) и тзв. скевендер-рецепторе. Настали оксиданси оксидационо модификују *LDL* честице (*ox-LDL*) које моноцити, макрофаги и глаткомишићне ћелије преузимају помоћу скевендер-рецептора. *Ox-LDL* надаље активира моноците и макрофаге и стимулише експресију *MnSOD*, која повећава садржај H_2O_2 . Атерогени стимулуси инхибирају експресију антиоксидационих ензима (*CAT*, *SOD*, *GPx* и глутатион *S*-трансферазе), што продубљује оксидациони стрес [25].

Еволуцији атеросклерозе доприносе цитокини (*TNF*-, *IL-1 β* , *iFN γ*) и други фактори (ангиотензин *II*) који стимулишу стварање супероксида мембранском *NADPH*-оксидазом ћелија ендотела [26]. Оксидација *NO* помоћу O_2 доводи до стварања пероксинитри-

та, који може да иницира пероксидацију липида или оксидацију липопротеина. Налаз слободног гвожђа у атеросклерозним лезијама указује на то да и стварање слободних радикала катализом гвожђа може бити значајно за развој атеросклерозе [27].

Главни извори оксидационог стреса у кардиоваскуларном систему су: ензими ксантин-оксидаза, *NADPH*-оксидаза, *iNOS*, митохондријални цитохроми и хемоглобин. *NOS* и хемоглобин су такође извори реактивних врста азота, односно *NO* и *SNO* (*SH*-група цистеина модификованих азот-моноксидом у аминокиселинама, пептидима и протеинима). Реактивне врсте кисеоника оксидативно модификују липиде и протеине, што доводи до пропустљивости мембране и промене функције оштећењем липидног двослоја и модификацијом различитих протеина. У миоцитима настају поремећаји у ћелијским органелама. У сарколеми оксидациони стрес инхибира аденозинтрифосфатазу, акумулацију Ca^{2+} и акумулацију Ca^{2+} која зависи од АТП, стимулисану активност АТП-азе, а ови процеси су у корелацији с повећањем концентрације малондиалдехида (*MDA*). Супероксид, *OH* и *NO* ослобађају Ca^{2+} из саркоплазматског ретикулума [28]. Повећање концентрације Ca^{2+} у миоцитима може бити изазвано директним дејством реактивних врста кисеоника на протеине који везују Ca^{2+} , индиректно пероксидацијом мембранских липида или недостатком АТП услед исхемије. Реперфузија такође повећава улаз ванћелијског Ca^{2+} у миокард. Повећање концентрације Ca^{2+} у ћелији стимулише неоинтимну хиперплазију, а тиме и настанак атеросклерозе, вазоконстрикције (хипертензија), исхемијско-реперфузионог оштећења и хипертрофије срца код инсуфицијенције срца. Ови процеси такође доводе до апоптозе макрофага и стварања и еволуције атеросклерозних лезија. Поменути ефекти се могу превенирати помоћу *SOD* и каталазе.

Оксидациони стрес је значајан чинилац и у настанку хипертензије. Супероксид стимулише пролиферацију ћелија, а H_2O_2 доводи до апоптозе и активира протеин-киназу *C*. Код особа које пате од хипертензије, поред оксидационог стреса, бележе се и снижене вредности антиоксиданса, као што су витамин *E*, *GSH* и *SOD*, који су потентни скевендери слободних радикала. Код особа с хроничним болестима могу се јавити значајно повишене концентрације *GSH* у крви, липидних пероксида у плазми и активност глутатион *S*-трансферазе и каталазе у плазми [29]. Лечење *ACE* инхибиторима доводи до значајног смањења нивоа пероксида и активности ензима, али не и до нормализације *GSH*. Глутатион-пероксидаза може показивати инверзан профил у односу на здраве особе. Наиме, код болесника с хипертензијом *GPx* еритроцита зависна од селена (*Se*) значајно је нижа, а *Se*-независна значајно виша него код здравих особа [30], што упућује на повећано стварање органских хидропероксида, који су супстрат за ензим независан од *Se*.

Ангиотензин II (*Ang II*) је мултифункционални хормон који регулише раст ћелија, апоптозу, миграцију, запаљење и фиброзу. Он има кључну улогу у регулацији крвног притиска и хомеостазе телесних течности. У хипертензији стимулише стварање реактивних врста кисеоника у глаткомишићним васкуларним ћелијама, стварање H_2O_2 и OH у плазми и инхибира синтезу NO .

Оксидациони стрес може довести до ослобађања цитохрома C из митохондрија. Цитохром C је нормално везан за кардиолипин (којим је срце богато) у унутрашњој мембрани митохондрија [31]. Пероксидација кардиолипина изазива дисоцијацију и ослобађање цитохрома C у цитозол. Пролаз кроз спољашњу мембрану митохондрија омогућавају такође реактивне врсте кисеоника које оксидирају сулфхидрилне групе аденин-нуклеотид транслокатора, који делом учествују у стварању транзиторних пора митохондрија.

Реактивни метаболити оштећују срце и оксидационом модификацијом конституената ћелија (углавном протеина критичних за ексцитацију и контракцију) и смањењем расположивог NO . Једна од значајних улога NO је S -нитрозилација протеина, процес којим NO модулира различите ћелијске процесе. Директном инактивацијом NO реактивне врсте кисеоника могу смањити ове ефекте оксидацијом хемијских група у протеину са којима иначе NO реагује. Ензими који стварају оксидансе се у већој мери синтетишу током слабости срца, а NO синтазе и XO су поремећене количине и локализације [32]. Делом због повећања концентрације ангиотензина II $NADPH$ -оксидаза је стимулисана, а повећање нивоа O_2^- може инактивисати NO . Нерегулација NO може бити и последица повећане активности XO . У физиолошким условима концентрација NO је већа од концентрације O_2^- , те је фаворизована S -нитрозилација протеина. Поремећај односа NO и O_2^- , који се јавља током инсуфицијенције срца, фаворизује реакције оксидације и нитрозилацију пероксинитритом. ACE инхибитори стимулишу стварање NO повећањем брадикинина, а смањују реактивне врсте кисеоника због изостанка стимулишуће активности ангиотензина II на $NADPH$ -оксидазу. Неки од савремених лекова, као што су инхибитори система ренин-ангиотензин-алдостерон и $HMG-CoA$ редуктазе, регулишу равнотежу NO и редокса.

ДИЈАБЕТЕС

Оксидациони стрес је један од главних узрока компликација дијабетеса. Нормално, инсулин се везује за своје рецепторе у циљним ткивима, након чега се сигнал преноси на рецепторске супстрате 1 и 2 инсулина ($IRS1$, $IRS2$), који регулишу метаболичке функције овог хормона. Фосфорилација остатка тирозина у $IRS1$ критична је за одговоре стимулисане инсулином, док фосфорилација остатка серина појачава

или прекида дејство инсулина. Активација протеинкиназе B инсулином пропагира инсулински сигнал и доводи до фосфорилације остатка серина, што је праћено позитивном повратном спрегом (енгл. *feedback*), односно испољавањем дејства инсулина [33]. Многи агенси који изазивају резистенцију на инсулин (ангиотензин II, цитокини, SMK , ендотелин 1, оксидациони стрес, хиперинсулинемија) доводе до активације серин-тиреонин киназа и фосфорилисања $IRS1$ [34], али и до његове деградације или гликозилације и последичне негативне регулације овог супстрата.

Извори слободних радикала у дијабетесу су: комплекс II респираторног ланца митохондрија (1), $NADPH$ -оксидаза (у ћелијама васкулатуре и бубрега), у чијој активацији улогу игра и ангиотензин II будући да је хипертензија честа компликација дијабетеса (2), аутооксидација гликозе, при чему се ослобађа O_2^- и врши гликација протеина (3) [35]. Интеракција AGE (енгл. *advanced glycation end products*) с одговарајућим ћелијским рецепторима стимулише стварање реактивних врста кисеоника и смањење концентрације GSH у ћелији. Гликоза и њени метаболити могу реаговати са H_2O_2 у присуству јона гвожђа или бакра, уз ослобађање хидроксилног радикала (4). NO у реакцији са O_2^- ствара пероксинитрит (5), који анкуплује NOS , па ова, уместо NO , ствара O_2^- . Смањење нивоа NO настаје конверзијом у пероксинитрит и смањењем синтезе. Хипергликемија (6) такође доводи до експресије NOS активацијом PKC и $NF-\kappa B$ [36]. PKC се активира помоћу DAG , чије је стварање последица активације фосфолипазе C , и сматра се главним медијатором компликација дијабетеса јер стимулише експресију ендотелина 1, $iNOS$, инхибира експресију $NF-\kappa B$ и $AP-1$, стимулише фосфолипазу $A2$ (каскаду арахидонске киселине) и $NADPH$ -оксидазу и повећава синтезу фактора раста васкуларног ендотела. Ксантин-оксидаза (7) се сматра главним извором реактивних врста кисеоника у дијабетесу, што се показало механизмом који зависи од ткива. Експресија липооксигеназе (8) је повећана и удружена с повећаним стварањем еикосаноида.

Због оксидационог стреса, код особа које болују од дијабетеса су смањене концентрације антиоксиданса (витамина E и C), а поремећена је и експресија GPx . Код особа са дијабетесом код којих је оксидациони стрес доказан значајно повећаном активношћу XO и концентрације MDA у плазми постоји значајно повећање GPx у еритроцитима. Лечење метформином смањује вредности свих ових параметара [37].

ИМУНЕ БОЛЕСТИ

Системски лупус еритематодес (SLE) је хронична аутоимуна болест у којој аутоантитела (на многе антигене) и имунокомплекси доводе до оштећења ткива. Болест се одликује поремећајем T -ћелија, хиперактивношћу B -ћелија и поремећеним стварањем цито-

кина [38]. Запаљење у активној фази болести инфламаторним цитокинима покреће каскаду догађаја преко транскрипционог фактора *NF-κB*, који, поред осталог, изазива експресију *NADPH*-оксидазе и *NOS*. У одговор на *IL-1β* и после везивања *T*-лимфоцита за ко-стимулаторни рецептор *CD28*, 5-липооксигеназа лимфоцита ствара H_2O_2 . Примарно произведени радикали (помоћу ових индуцибилних ензима) и многи који се секундарно из њих стварају чине значајан оксидациони потенцијал [22] који може да оштети различите биомолекуле, укључујући ДНК, ДНК систем за опоравак, ензиме и цитохроме, што може инхибирати Кребсов циклус, антиоксидансе (каталаза, *GSH*) и друге биомолекуле. Један од значајних извора реактивних врста кисеоника у *SLE* је и ксантин-оксидаза, чија је активност у лупусу 50 пута повећана.

У различитим клиничким облицима *SLE* значајно повећање концентрације *XO* удружено је са значајним повећањем нивоа липидних пероксида, *NO* и *NOS* у плазми, глутатиона у крви, активности каталазе у плазми и еритроцитима, док је ниво *SOD* снижен, и то само у васкуларном лупусу [39]. Активност *XO* негативно корелира с количином сулфхидрилних група (које су осетљиви показатељи оксидационог стреса), које су 45-75% смањене код болесника са *SLE*. Поремећаји микроциркулације доводе до делимичне или потпуне исхемије. Примена адекватног лечења доводи до реперфузије и у том случају *XO* постаје снажан генератор реактивних врста кисеоника. Накнадна инфилтрација фагоцитима и активација ендотела додатни су произвођачи оксиданса.

БРОНХИЈАЛНА АСТМА

С обзиром на то да је у алвеолама плућа парцијални притисак кисеоника много већи него у другим виталним органима и да у ваздуху постоје иританси и загађивачи, ткиво плућа је више него друга ткива изложено оксидансима. Многи експериментални и клинички подаци показују да оксиданси играју значајну улогу у патогенези различитих болести дисајног тракта, укључујући и бронхијалну астму. Оксидациони стрес учествује у иницијацији и развоју ове болести. Хронично запаљење ваздушних путева, које одликује астму, праћено је израженим оксидационим стресом. Такође, многи оксидачи који доводе до погоршања ове болести, као што су вирусна инфекција и загађивачи ваздуха, могу покренути стварање оксиданса и интензивирати процес запаљења. Примарна места стварања слободних радикала у ћелијама плућа, као у већини живих ћелија у физиолошким условима, јесу митохондрије, мембранска *NADPH*-оксидаза, *NOS* и *XO* [40].

Додатни извор слободних радикала у ваздушним путевима болесника који пате од астме су инфламаторне ћелије које инфилтришу ове просторе. Када пристигну у ваздушне путеве, еозинофили, неутро-

фили, моноцити и макрофаги се активирају. Активирани мобилисане ћелије, али и резидентне ћелије, као што су епителне ћелије бронхија, стварају реактивне врсте кисеоника и азота [41, 42]. Примарно се ствара O_2^- помоћу мембранске *NADPH*-оксидазе, цитозолске *XO* и респираторног ланца митохондрија, који се потом конвертује у H_2O_2 . Дејством лизозомне мијелопероксидазе (*MPO*) неутрофила, моноцита и макрофага H_2O_2 оксидира преобладајуће хлор у хипохлорну киселину, а дејством еозинофилне пероксидазе настаје превасходно хипобромна киселина. С обзиром на то да еозинофили садрже неколико пута више пероксидазе него неутрофили *MPO*, то еозинофили имају неколико пута већи оксидациони капацитет [40]. Хипохлорна и хипобромна киселина могу реаговати са нитритима и H_2O_2 , што доводи до стварања реактивних врста азота. Услед индукције *NADPH*-оксидазе и *NOS*, у повећаној мери се ствара и пероксинитрит. Због посебне изложености плућа оксидансима, антиоксидациони систем плућа показује низ специфичности. Типично обележје плућа људи је висок садржај глутатиона у течности која облаже епител (око 140 пута је већи него у крви), због чега се сматра главним антиоксидансом плућа. Алвеоларне епителне ћелије тип *II* отпорне су на оксидациони стрес због тога што у већој мери експримирају *CuZnSOD*, *MnSOD* и каталазу [40]. Насупрот њима, алвеоларне епителне ћелије тип *I* експримирају мање ензима одбране, због чега су осетљивије на оксидациони стрес. И алвеоларни макрофаги у већој мери експримирају каталазу. Макрофаги и друге ћелије ваздушних путева експримирају системе тиоредоксин-тиоредоксин редуктазу, тиоредоксин пероксидазе и глутаредоксин, који могу разлагати H_2O_2 [43].

Код болесника с астмом, сем у плућима, оксидациони стрес постоји и у циркулацији. Показатељи стреса су повећани у леукоцитима, периферној крви, индукваном спутуму, бронхоалвеоларном лаважу, урину и ткивима болесника. У издахнутом ваздуху бележе се H_2O_2 , *NO*, нитротирозин, изопростани, етан и хидроксидеокигванозин [44]. Нитротирозин је повећан у епителним и глаткомишићним ћелијама и еозинофилима бронхија и плућног паренхиме, а трибромтирозин у спутуму болесника [42]. У плазми болесника значајно је повећана концентрација липидних пероксида и у позитивној је корелацији с активношћу *XO*. Активност каталазе у плазми такође је значајно повећана независно од тежине и облика болести; активност истог ензима у еритроцитима повишена је у тзв. екстринзич астми, а еритроцитна *SOD* значајно снижена у тзв. интринзич астми. Глутатион у крви, *GPx* еритроцита *NO* и *NOS* у плазми показују значајно веће вредности код особа које болују од астме него код здравих особа [45]. Ниво *NO* је снижен у респираторном систему јер се везује за редукционе агенсе, као што је глутатион, стварајући *S*-нитрозотиоле релативно отпорне на оксидансе [46]. Постоје и подаци који говоре о томе да је и садржај неензимских

антиоксиданса поремећен код болесника с бронхијалном астмом.

ЗАКЉУЧАК

Реактивне врсте кисеоника и азота се стварају током нормалног метаболизма у хелији. У физиолошким условима делују као секундарни носиоци информација у контроли разних функција организма и у одржавању тзв. редокс-хомеостазе, штитећи хелије од оксидационог стреса. Прекомерно стварање реактивних врста кисеоника, пре свега, екцесивном стимулацијом *NADPH*-оксидазе и ксантин-оксидазе или у респираторном ланцу митохондрија, доводи до оксидационог стреса. Оксидационом модификацијом биомолекула ремети се њихова функција и оштећују хелијске структуре, што је у основи патогенезе многих болести.

ЗАХВАЉНИЦА

Рад је посвећен академику Владимиру Пантићу.

НАПОМЕНА

Истраживање је финансирано Министарство науке и заштите животне средине Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

1. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954; 174:689-91.
2. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11:298-300.
3. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-56.
4. Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:4360-64.
5. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9265-9.
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2001; 82:47-95.
7. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *IJBCB* 2006 [in press].
8. Cadenas E, Sies H. The lab phase. *Free Radic Res* 1998; 28:601-9.
9. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59:527-605.
10. Muller FL, Lin Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004; 279:49064-73.
11. Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J. Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine* 1983; 62:286-309.
12. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid *NADPH* oxidase. *J Biol Chem* 1999; 274:37265-9.
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219:1-14.
14. Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂ in the production of HO: *In vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:29-33.
15. Han D, Canali R, Garcia J, Aguilera R, Gallaher TK, Cadenas E. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: Modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry* 2005; 44:11986-96.
16. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65:1865-74.
17. Carr A, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1716-23.
18. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:323-50.
19. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. *Biohemija slobodnih radikala*. Niš: Medicinski fakultet; 2000.
20. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16:577-86.
21. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104:6255-85.
22. Đorđević BV. Free radicals in cell biology. In: Jeon KW, editor. *A Survey of Cell Biology*. San Diego, California: Elsevier Academic Press; 2004. p.57-89.
23. Đorđević BV, Cvetković T, Deljanin-Ilić M, et al. The interaction between oxidative stress and biomarkers of inflammation in atherosclerosis. *Jugoslav Med Biochem* 2006; 25:335-41.
24. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Endovasc Surg* 2006; 31:386-93.
25. T'Hoën PAC, van der Lanc CAC, van Eck M, Bijstervosch MK, van Berkel TJC, Twisk J. Aorta of apoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circ Res* 2003; 93:262-9.
26. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumor necrosis factor- α activates a p22^{phox}-based *NADPH* oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998; 329:653-7.
27. Yuan XM, Li W. The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* 2003; 35:578-91.
28. Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 1997; 21:19-29.
29. Đorđević BV, Pavlović D, Pejović M, Cvetković T, Lečić N, Deljanin-Ilić M. Changes of lipid peroxides and antioxidative factors levels in blood of patients treated with ACE inhibitors. *Clin Nephrol* 1997; 47:243-7.
30. Đorđević BV, Grubor-Lajšić G, Jovanović-Galović A, et al. Selenium-dependent GSH-Px in erythrocytes of patients with hypertension treated with ACE inhibitors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998; 17:277-80.
31. Robinson NC. Functional binding of cardiolipin to cytochrome-c-oxidase. *J Bioen Biomembr* 1993; 25:153-63.
32. Damsy T, Ratajczak P, Shah AM, et al. Increased neuronal nitric oxide synthase derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 2004; 363:1365-7.
33. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: A key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001; 114:2903-10.
34. Vicent D, Ilany J, Kondo T, et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 111:1373-80.
35. Đorđević V. δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes of diabetic patients. *Arch Int Physiol Biochim* 1985; 93:285-90.
36. Hink U, Li HG, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88:E14-E22.
37. Čosić V, Anstić S, Pešić M, Jovanović O, Kundalić S, Đorđević BV. Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in Type 2 diabetic patients? *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:818-21.
38. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18:565-70.

39. Zvezdanović L. Proučavanje citokina i oksidacionog stresa kod bolesnika sa sistemskim lupusom eritematodesom [doktorska disertacija]. Niš: Univerzitet u Nišu; 2006.
40. Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 1995; 73:3-19.
41. Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000; 55(Suppl 2): S51-3.
42. Caramori G, Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax* 2004; 59: 170-3.
43. Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2:811-20.
44. Kharintonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7:1-32.
45. Ćosić V. Međuzavisnost citokina, antioksidanata i sistema azot-monoksida kod bolesnika sa bronhijalnom astmom [doktorska disertacija]. Niš: Univerzitet u Nišu; 2005.
46. Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58:175-82.

OXIDATIVE STRESS IN HUMAN DISEASES

Vidosava B. DJORDJEVIĆ¹, Lilika ZVEZDANOVIĆ², Vladan ĆOSIĆ²

¹Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Niš, Niš;

²Centre for Medical Biochemistry, Clinical Centre Niš, Niš

ABSTRACT

Oxidative stress is a "privilege" of aerobic organisms. It can be induced by endogenous and exogenous factors. Most often, it is characterized by the production of free radicals and nonradical oxygen and nitrogen products, referred to under a single term "reactive species" (RS). Oxidative stress is a deleterious process that can be an important mediator of damage to cell structures, including lipids and membranes, proteins and DNA. However, reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) are "two-faced" products. Produced in low/moderate concentrations as molecular signals that regulate a series of physiological processes, such as a defence against infectious agents, the maintenance of vascular tone, the control of ventilation and erythropoietin production, and signal transduction from membrane receptors in various physiological processes. Many of ROS-mediated responses protect cells against oxidative stress and maintain "redox homeostasis". Then, both reactive species are produced by strictly regulated enzymes, such as nitric oxide synthase (NOS), and isoforms of NADPH oxidase,

or as by-products from not so well regulated sources, such as the mitochondrial electron-transport chain. An excessive increase in ROS production has been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis, cardiovascular diseases, hypertension, ischemia/reperfusion injury, diabetes mellitus, neurodegenerative and immuno-inflammatory diseases. Within the cells, ROS can act as secondary messengers in intracellular signalling cascades, which can induce the oncogenic phenotype of cancer cells, cellular senescence and apoptosis.

Key words: oxidative stress; reactive oxygen species; reactive nitrogen species; human diseases

Vidosava B. ĐORĐEVIĆ
 Institut za biohemiju
 Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu
 Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš
 Tel.: 018 535 666
 E-mail: czmb_kc_nis@yahoo.com