

# LIPIDNA PEROKSIDACIJA - UZROCI I POSLJEDICE

---

Štefan, Leo; Tepšić, Tina; Zavidčić, Tina; Urukalo, Marta; Tota, Dalibor;  
Domitrović, Robert

Source / Izvornik: **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2007, 43., 84 - 93**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:513232>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of  
Medicine - FMRI Repository](#)



## LIPIDNA PEROKSIDACIJA – UZROCI I POSLJEDICE

## LIPID PEROXIDATION – CAUSES AND CONSEQUENCES

*Leo Štefan<sup>1</sup>, Tina Tepšić<sup>A</sup>, Tina Zavidic<sup>A</sup>, Marta Urukalo<sup>1</sup>, Dalibor Tota<sup>1</sup>, Robert Domitrović<sup>2</sup>*

### SAŽETAK

U normalnim biološkim uvjetima, molekula kisika neenzimatskom oksidacijom povremeno oduzima elektrone drugim molekulama, što uzrokuje nastanak slobodnih radikala. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) često su meta stvorenih slobodnih radikala, što posljedično lipidnu peroksidaciju. Unutarstanični i izvanstanični antioksidansi uklanjanjem reaktivnih spojeva kisika i dušika smanjuju mogućnost oksidacijskoga oštećenja lipidnih molekula, u prvom redu PUFA-e, ali i drugih spojeva. Enzimatska kataliza jest najučinkovitiji postupak uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). U organizmu postoji nekoliko skupina antioksidacijskih enzima uključujući superoksid dismutazu (SOD) za uklanjanje superoksidnoga radikala i katalaza (CAT), te glutation peroksidazu (GPx) za uklanjanje vodikova peroksida i organskih peroksida. Oštećenje lipida može se odrediti mjerenjem količine malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE), izoprostana, te drugih produkata lipidne peroksidacije. Povećana lipidna peroksidacija povećava rizik za razvoj ateroskleroze i drugih upalnih bolesti.

*Ključne riječi:* reaktivni kisikovi spojevi, antioksidansi, lipidna peroksidacija, ateroskleroza

### ABSTRACT

Occasionally, under normal biological conditions, oxygen does manage to steal away electrons from other molecules by nonenzymatic autoxidations, which results in the free radical formation. Polyunsaturated fatty acids frequently serves as the target for generated free radicals, inducing lipid peroxidation. Intracellular and extracellular antioxidants attenuate oxidative damage of lipid molecules, primarily PUFA, but also other molecules. The most efficient way to eliminate undesirable toxic species is by means of enzyme catalysis. Families of antioxidant enzymes have evolved for this purpose, including superoxide dismutases (SOD) for the elimination of the superoxide radical, and catalases (CAT) and glutathione peroxidases (GPx) for the elimination of hydrogen peroxide and organic peroxides. Lipid damage could be determined by measuring the amount of malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE), isoprostanes and other products of lipid peroxidation. Increased lipid peroxidation increase the risk of atherogenesis and other inflammatory diseases.

*Key words:* reactive oxygen species, antioxidants, lipid peroxidation, atherosclerosis

### SLOBODNI RADIKALI U STANICI

Slobodni radikali jesu vrlo nestabilne kemijske čestice koje u vanjskoj ljusci imaju nesporeni elektron. Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Zbog nesporenoga elektrona, slobodni su radikali vrlo reaktivni. Stvaranje slobodnih radikala u uskoj je sprezi s aerobnim metabolizmom. Relativno male količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), trajno se proizvode u svim aerobnim organizmima. Velike količine ili

<sup>1</sup> studenti Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Rijeci

<sup>2</sup> Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

Primljeno: 2. kolovoza 2007.

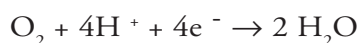
Prihvaćeno: 10. kolovoza 2007.

Adresa za dopisivanje: doc. dr. sc. Robert Domitrović, Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, B. Branchetta 20, 51000 Rijeka, tel./faks + 385 51 651 135, e-mail: robertd@medri.hr

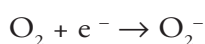
nedovoljno učinkovito uklanjanje ROS-a, posljediče oksidacijskim stresom koji može oštetiti biološke makromolekule i uzrokovati metaboličke poremećaje. ROS ima neprijepornu važnost u mnogobrojnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi, te imunološkom odgovoru<sup>1</sup>. Aktivirane fagocitotičke stanice poput monocita, neutrofila, eozinofila i makrofaga, proizvode ROS kao dio mehanizma uništavanja mikroorganizama nakon fagocitoze<sup>2</sup>. S druge strane pak, kisikovi radikali mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu<sup>3</sup>. Također, prisutnost slobodnih radikala može polučiti i citotoksično djelovanje, što posljediče staničnom smrti, induciranjem mutacija i kromosomskih aberacija, te kancerogenezom.

### REAKTIVNI SPOJEVI KISIKA I DUŠIKA (ROS I RNS)

Kisik je snažno oksidacijsko sredstvo. Reakcija potpune redukcije kisika ima veliki redukcijski potencijal (približno 0,8 V), premda je za nju potrebna i velika energija aktivacije<sup>4</sup>. Stoga je reakciju poput one u respiratornome lancu u mitohondrijima relativno teško postići:



Molekula kisika u osnovnome stanju ima dva nesparena elektrona. Primanjem jednog elektrona nastaje superoksidni radikal ( $\text{O}_2^-$ ), a primanjem sljedećeg elektrona nastaje  $\text{O}_2^{2-}$  koji protoniranjem prelazi u vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):

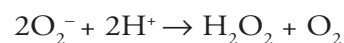
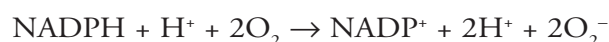


Superoksidni radikal u vodenim je medijima poput citoplazme slabi oksidans, a mnogo je snaž-

nije redukcijsko sredstvo koje može reducirati željezne komplekse poput citokroma c.

Hidroperoksidni radikal ( $\text{HO}_2^-$ ) jači je reducens i oksidans od superoksidnog radikala, negoli prisutan u malim količinama pri pH = 7,4. Vodikov peroksid nastaje kao proizvod djelovanja urat oksidaze, glukoza oksidaze, D-aminokiselinske oksidaze, ili superoksid dismutaze (SOD). Vodikov peroksid lako može prolaziti kroza staničnu membranu, a u prisutnosti iona prijelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale. Razgrađuje se djelovanjem katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), te pojedinih drugih peroksidaza.

Unutar stanice slobodni kisikovi radikali mogu nastati tijekom uobičajenih staničnih procesa, ili mogu biti inducirani određenim egzogenim tvarima. Stoga izvore superoksidnoga radikala možemo podijeliti na enzimске (tijekom katalitičkih reakcija NADPH oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin oksidaze, superoksid dismutaze), stanične (radom makrofaga, leukocita, u respiratornome lancu, djelovanjem mikrosomalne oksigenaze), te na izvore nastale djelovanjem okruženja (UV-svjetlo, X-zrake, toksične kemikalije, aromatski nitrosojevi i drugo). NADPH oksidaza jest membransko vezani višenzimski sklop koji ima izrazitu važnost u stvaranju ROS-a. Budući da taj sklop nije jednako izražen u svim stanicama, u pojedinim su stanicama za njegovu aktivaciju potrebni medijatori (kemokini, te kemoatraktivni peptidi), a djelovanje enzima veže se uz neutrofile koji tijekom stvaranja ROS-a troše velike količine kisika (povećana respiracija neutrofila)<sup>5,6</sup>. NADPH stvara superoksidni radikal koji dismutacijom prelazi u vodikov peroksid:



Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi  
Table 1 *Reactive oxygen species*

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
superoksidni, $\text{O}_2^-$	vodikov peroksid, $\text{H}_2\text{O}_2$
hidroksilni, $\text{OH}^\bullet$	hipokloritna kiselina, $\text{HClO}$
peroksilni, $\text{ROO}^\bullet$	ozon, $\text{O}_3$
alkoksilni, $\text{RO}^\bullet$	singletni kisik, $^1\text{O}_2$
hidroperoksilni, $\text{HO}_2^\bullet$	

Nastali vodikov peroksid u prisutnosti iona željeza i bakra daje reaktivne hidroksilne radikale i (ili) hipokloritnu kiselinu (HOCl) u prisutnosti Cl<sup>-</sup> iona, čije nastajanje katalizira enzim mijeloperoksidaza<sup>7</sup>. Stoga određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze može poslužiti kao pokazatelj infiltracije leukocita na mjestu upale<sup>8</sup>. Stvaranje radikala unutar mitohondrija nastaje kao posljedica nedostatka elektrona koji prelaze na kisik, reducirajući se pritom do O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Hidroksilni radikali nastaju enzimatski (neradikalnim putem, odnosno djelovanjem glikolat oksidaze, acetyl-Co oksidaze, NADPH oksidaze, urat oksidaze i drugim), te

dismutacijom superoksidnoga radikala (radikalni put). Singletni kisik (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) nema svojstva radikala, međutim vrlo je reaktivan zbog spinskih osobitosti (ima dva nesparena elektrona usporednoga spina). Uz reaktivne kisikove spojeve, veliku važnost imaju i reaktivni dušikovi spojevi od kojih su najvažniji NO<sup>•</sup>, te NO<sub>2</sub><sup>•</sup>. NO<sup>•</sup> jest relaksacijski čimbenik krvožilnoga sustava, koji kao radikal može reagirati s endogenim radikalima, primjerice sa superoksidnim radikalom, stvarajući peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>) koji su izrazito jaki oksidansi, a pri kiselome pH-u razgrađuju se do hidroksilnih radikala (neovisno o prisutnosti prijelaznih metala).

Tablica 2. Reaktivni dušikovi spojevi  
Table 2 *Reactive nitrogen species*

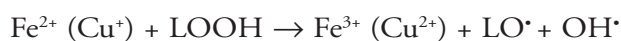
Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
dušikov (II) oksid, NO <sup>•</sup>	nitrozil, NO <sup>•</sup>
	nitritna kiselina, HNO <sub>2</sub>
dušikov (IV) oksid, NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	dušikov (III) oksid, N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup>
	alkilperoksinitrit, ROONO

## UTJECAJ ŽELJEZA NA STVARANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJEVA

Željezo ima zadaću prijenosnika elektrona između kisika i bioloških molekula<sup>9,10</sup>. Područje oksidacije organskih spojeva u prisutnosti željeza i vodikova peroksida naziva se Fentonovom kemijom, u čast H. J. H. Fentonu koji je u 19. stoljeću provodio istraživanja vezana uz oksidaciju vinske kiseline<sup>11</sup>. Hidroksilni radikal (HO<sup>•</sup>), jedan od najsnažnijih poznatih oksidansa, može nastati Fentonovom reakcijom:



Željezo može reagirati i s lipidnim hidroperoksidima (LOOH), dajući reaktivne lipidne alkoksilne radikale LO<sup>•</sup> koji dalje sudjeluju u širenju lipidne oksidacije:



Željezo je izravno povezano s lipidnom peroksidacijom, a ta je pojava praćena povećanjem malondialdehida (MDA) i drugih reaktivnih spojeva s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS)<sup>12</sup>. Unos velikih količina željeza i bakra dovodi do degenerativnih

bolesti mozga i razvoja tumora, a zabilježene su i promjene u aktivnosti superoksid dismutaze<sup>13,14</sup>. Također, željezo je odgovorno za promjene u metabolizmu prostaglandina E<sub>2</sub><sup>15</sup>.

## MEHANIZAM LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu, mnogo su otpornije prema djelovanju ROS-a negoli PUFA-e. *In vitro* proučavanja pokazala su da dokozahexaenska kiselina (C22:6) ima pet puta veću sposobnost oksidacije od linolne kiseline (C18:2).

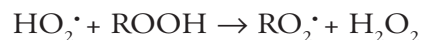
Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>), međutim i pojedini drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije. Proces lipidne peroksidacije obilježuju tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Reakcija molekularnoga kisika s višestruko nezasićenim masnim kiselinama (PUFA), spinski je zabranjena. Stoga, peroksidacija je moguća slobodnoradikalnim mehanizmom kojim se premošćuje spinska prepreka između kisika i PUFA-e.

U lipidnim sustavima započinjanje peroksidacijskoga niza odnosi se na napad ROS-a, sposobnoga da izdvoji atom vodika iz metilenske skupine

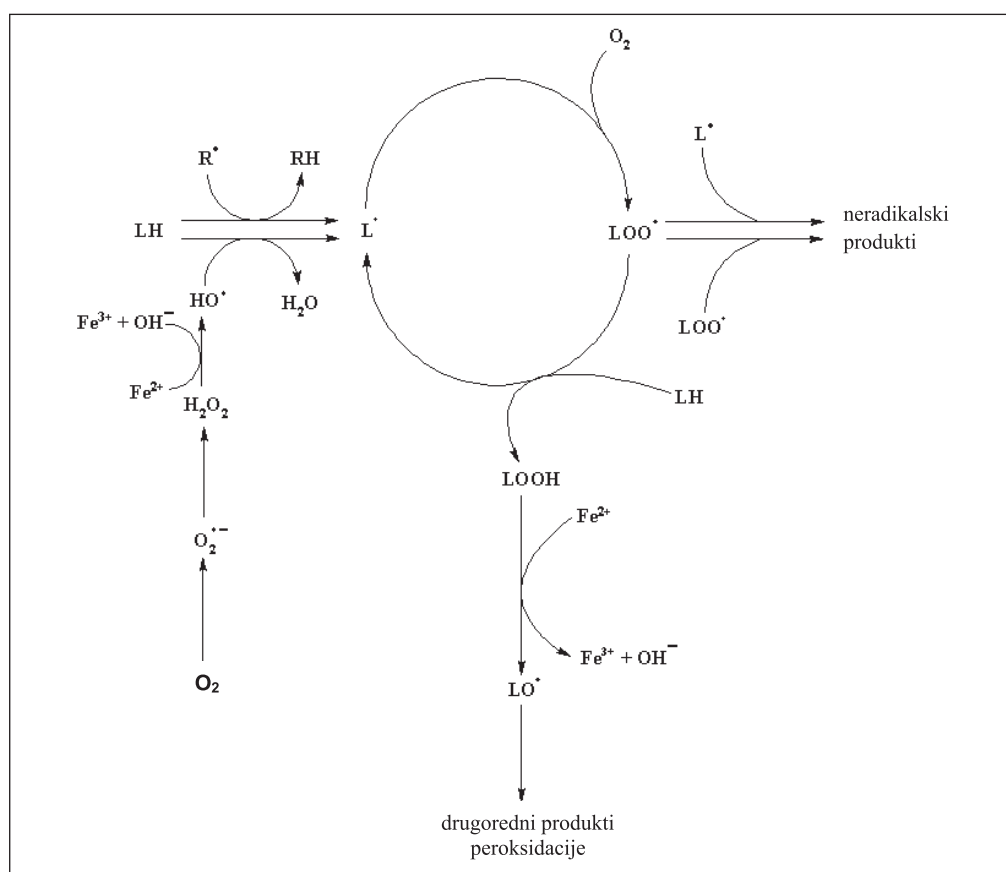
( $-\text{CH}_2-$ ). Tako iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali (slika 1.). Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ , te  $\text{RO}_2^\bullet$ ; a superoksidni je radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika. Tokoferol i manitol priječe peroksidacijski proces. Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomu ugljika u blizini dvostruke veze, te tako premještanje vodika čine lakšim. Ugljikovi radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene<sup>16</sup>. U aerobnim uvjetima konjugirani dieni mogu se spajati s  $\text{O}_2$ , te stvarati peroksilne radikale  $\text{LOO}^\bullet$  koji dalje mogu eliminirati  $\text{H}^\bullet$  iz koje druge organske molekule, uključujući PUFA-u, pri čemu dolazi do oblikovanja lipidnih hidroperoksida (uključujući cikličke peroksidge), te reaktivnih ugljikovih radikala koji nastavljaju reakciju slobodno radikalskim mehanizmom (faza propagacije). Tijekom propagacije  $\text{LOOH}$  u prisutnosti željeza disocira do  $\text{LO}^\bullet$  i  $\text{LOO}^\bullet$  koji dovode do reinicijalizacije peroksidacije. Lipidnu peroksidaciju katalizira hemski i nehemski vezano željezo. Disocijacijom  $\text{LOOH}$ -a dolazi do

nakupljanja kratkolančanih konačnih produkata peroksidacije vrste aldehida i ugljikovodika.

Superoksidni radikal negativna je naboja, te nema sposobnost ulaska u unutrašnjost stanične membrane (izuzetak je ulazak anionskim kanalima, međutim na svojem putu ne reagira s PUFA-om), što je dodatni razlog kojim se objašnjava njegovo nesudjelovanje u lipidnoj peroksidaciji. Hidroperoksilni radikal ( $\text{OH}_2^\bullet$ ) vrlo je reaktivan, te može potaknuti peroksidaciju stvarajući peroksidne radikale:



Unos masnih kiselina hranom, poglavito  $\omega$ -3 PUFA-e, posljeduje povećanjem aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze, što upućuje na povećanu lipidnu peroksidaciju<sup>12</sup>. Pokazano je da unos  $\omega$ -3 PUFA-e prehranom, može dovesti do njegoja povećanja u staničnim membranama, što je nadalje iskorišteno u proučavanju tumorskoga širenja, pri čemu višak  $\omega$ -3 PUFA-e može dovesti do povećanja lipidne peroksidacije i nakupljanja toksičnih produkata, te inhibicije rasta tumora<sup>17</sup>.



Slika 1. Pregled lipidne peroksidacije  
Figure 1 Overview of the lipid peroxidation

## PRODUKTI LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Pod djelovanjem iona željeza ili bakra, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte – od aldehida, ketona, ugljikovodika (etana, etena, pentana), epoksida, do aktivnih radikala. Malondialdehid (MDA) koji se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama (u zamjetno većim količinama stvara se peroksidacijom mikrosoma jetre), pokazatelj je peroksidacije. MDA koji postoji u različitim oblicima, u fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolalnog iona koji interreagira s proteinima, pokazujući izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Gvanin u DNA također je ciljno mjesto napada malondialdehida, što može stvarati mutagena oštećenja. U organizmu MDA se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze.

Produkt peroksidacije  $\omega$ -6 PUFA-e (linoleinske i arahidonske), hidroksialkenal 4-hidroksinonenal (HNE), u većim količinama ima izrazito toksično djelovanje, inhibira stanični rast, sposoban je modificirati lipoproteine, te potaknuti razvoj ateroskleroze<sup>18</sup>. Hidroksialkenali koji su reaktivni zbog prisutnosti triju funkcionalnih skupina (aldehidne, hidroksilne i dvostruke veze), u fiziološkim uvjetima pokazuju afinitet prema amino skupinama u DNA bazama, proteinima (lizinskim ostacima u lipoproteinima), fosfolipidima (poglavito prema fosfatidil-serinu i fosfatidil-etanolaminu). Također, pokazuju i određenu selektivnost prema -SH skupinama u albuminu. HNE se metabolizira stvarajući GSH-konjugate preko glutation transferaza koji dalje prelaze u merkapturane kiseline, te se izlučuju mokraćom. Yang i suradnici opisali su nastanak HNE-a, glavnoga produkta lipidne peroksidacije i njegova epoksida, epoksi-4-hidroksinonenala u plućnomu tkivu pušača<sup>19</sup>. El Ghissassi i suradnici pokazali su da produkti lipidne peroksidacije stvaraju 1, *N*-6-etenodeoksiadenozinske i 3, *N*-4-etenodeoksicitidinske adukte koji mogu poslužiti kao markeri oksidacijskoga stresa<sup>20</sup>.

Još jedna toksična skupina spojeva produkata lipidne peroksidacije jesu izoprostani, a stvaraju se oksidacijom fosfolipida. Izoprostani jesu izomeri prostaglandina s kojima imaju popriličnu sličnost, no razlikuju se između ostaloga po tomu što izoprostani nastaju lokalno u membranama i mnogo su složeniji sustav. Zbog sličnosti s prostaglandinom  $F_{2\alpha}$  ( $PG_{2\alpha}$ ), izoprostani se nazivaju i  $F_2$ -izoprostanima. Koriste se kao markeri lipidne peroksidacije, te se mogu određivati u ljudskoj plazmi i u

mokraći. Pri povećanim koncentracijama u plazmi,  $F_2$ -izoprostani mogu sudjelovati u stvaranju hepatorenalnoga sindroma<sup>21</sup>. Snažan bubrežni i plućni vazokonstriktor jest 8-epi- $PGF_{2\alpha}$  koji reducira bubrežni protijek krvi i glomerularnu filtraciju. Izoprostani koji su biološki aktivni, djeluju kao snažni plućni i bubrežni vazokonstriktori, te se smatraju posrednicima u razvoju hepatorenalnoga sindroma i toksičnoga djelovanja kisika u plućima<sup>22</sup>. Također, 8-epi- $PGF_{2\alpha}$  predložen je kao biljeg nedostatka antioksidansa i oksidacijskog stresa, te također može poslužiti kao pokazatelj kakvoće uzoraka koji sadržavaju lipide – bilo da se radi o serumu, plazmi, ili izoliranim stanicama. Nedavno je pokazano da oksidacijom eikozapentaenske kiseline (EPA), najzastupljenije PUFA-e u ribljem ulju, nastaju  $F_3$ -izoprostani, spojevi slični  $F_2$ -izoprostanima<sup>23</sup>. Stvaranje izoprostana također odražava oksidacijski stres u aterosklerozi<sup>24</sup>.

## POSLJEDICE LIPIDNE PEROKSIDACIJE U BIOLOŠKOMU MATERIJALU

Intenzivna lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema  $H^+$  i drugim ionima, te do moguće rupture stanice i otpuštanja njena sadržaja.

Različiti spektar tehnika korišten je za dokazivanje povećane lipidne peroksidacije u različitim patološkim stanjima<sup>25</sup>. Ustanovljeno je da tkiva poremećena rada brže ulaze u lipidnu peroksidaciju, a razlog veće peroksidabilnosti uključuje inaktivaciju, odnosno manjak antioksidacijskih mehanizama, otpuštanje metalnih iona (željeza i bakra) iz mjesta skladištenja, te metaloproteina koji su hidrolizirani enzimima otpuštenih iz oštećenih lizosoma.

## PEROKSIDACIJA LIPOPROTEINA I UTJECAJ NA ATEROSKLEROZU

Povećana lipidna peroksidacija povećava rizik za razvoj ateroskleroze i drugih upalnih bolesti<sup>26</sup>. Stvaranje plaka povezano je s oksidacijskim stresom i potrošnjom kisika, te povećanjem količine oksidirana glutationa (GSSG)<sup>27</sup>. Porast GSSG-a uvjetuje stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva poput superoksidnog aniona i  $H_2O_2$ , koji se stvaraju tijekom agregacije. Potencijalni izvori reaktivnih kisikovih spojeva uključuju ciklooksigenaze, lipooksigenaze, čak i NADPH oksidazu<sup>28,29</sup>. Prijašnja istraživanja ukazala su na utjecaj superoksidnog aniona na

nakupljanje trombocita<sup>30</sup>, međutim mehanizam nije u potpunosti utvrđen. S druge strane pak, dok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri malim, mikromolarnim količinama, priječi nakupljanje trombocita djelomice zbog povećanja količine cGMP-a, pri milimolarnim vrijednostima stimulira njihovo nakupljanje<sup>31,32</sup>. To opažanje ukazuje na to da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olakšava prianjanje tijekom nakupljanja fosforilacijom tirozina u fibrinogenkim receptorima<sup>33</sup>.

U aterosklerotičnim oštećenjima pronađeno je nekoliko različitih vrsta produkata oksidacije masnih kiselina. Najprije su otkriveni hidroksilni produkti linolne i hidroksioktadekanoenske kiseline (HODE)<sup>34,35</sup>. Ti spojevi, zajedno s hidroksieikosate traenskom kiselineom (HETE), najčešći su produkti lipidne oksidacije nađene u aterosklerotičnim oštećenjima. Mnogi od tih produkata nalaze se u obliku kolesterolnih estera<sup>36,37</sup>. To ne iznenađuje, budući da su kolesteril-linolat i kolesteril-arahidonat najčešći oksidirani lipidi u lipoproteinima niske gustoće (LDL), a LDL jest glavni izvor lipida koji se nakupljaju tijekom ateroskleroze. Jednom oksidirani LDL povećava svoju supstratnu sposobnost za sfingomijelinazu, enzim koji potiče agregaciju LDL-a<sup>38</sup>. Ako su makrofazi inkubirani i kultivirani uz visoku koncentraciju LDL-a, ne dolazi do povećanja kolesterolnih estera. Na osnovi navedenih postavki, pionirski rad J. L. Golsteina i suradnika pokazao je da kemijski modificirani LDL biva prepoznat od specifičnoga makrofagnoga receptora, što dovodi do ulaska LDL-a i kolesterola u stanicu<sup>39</sup>. Specifični makrofagni receptor nazvan je acetyl-LDL receptorom. Također, aktivnost tog receptora nije regulirana koncentracijom lokalnoga kolesterola, što dovodi do nakupljanja kolesterola u makrofazima koji su izloženi djelovanju oksidiranih LDL čestica. Ta istraživanja pokazuju molekularnu vezu između LDL-a i kolesterola, koja može dovesti do razvoja ateroskleroze<sup>40</sup>. Kombinacija uobičajenih čimbenika koji dovode do povećana krvnoga tlaka s već navedenim povećanjem koncentracije LDL-a i kolesterola u plazmi, upućuju na 50%-tni porast rizika za srčane bolesti.

Populacijske skupine koji koriste vegetarijansku i mediteransku prehranu, pokazuju manju smrtnost i pobol prema bolestima krvožilnoga sustava. Gey i autori proveli su epidemiološko istraživanje unutar 16 europskih populacija kako bi ispitali povezanost antioksidacijskih vitamina u plazmi i udjela smrtnosti uzrokovanog bolestima krvožilnoga sustava<sup>41,42</sup>. Rezultati su pokazali dobro poznati sjeverno – južni gradijent raspodjele bolesti krvožilnoga

sustava, te potvrdili činjenicu o važnosti antioksidansa u zaštiti LDL-a od oksidacije. Ipak, ne smije se zaboraviti da je navedeno istraživanje epidemiološko, stoga pokazuje međuovisnost sa srčanim bolestima, a ne njihove uzroke. Također, male koncentracije vitamina E mogu biti uzrokovane prooksidacijskim djelovanjem, a ne smanjenim unosom prehranom. Željezo je prooksidans, stoga može dovesti do raspadanja vitamina E, a istodobno željezo i bakar mogu biti rizični čimbenici za nastanak bolesti krvožilnoga sustava. Pravilna prehrana bitan je čimbenik u smanjivanju rizika za razvoj bolesti krvožilnoga sustava. Premda se smatra da riblje ulje bogato ω-3 PUFA-om ima zaštitno djelovanje u nastanku ateroskleroze i bolesti krvožilnoga sustava, čini se da druge sastavnice ribljega ulja štite od napada slobodnih radikala, jer su i same ω-3 PUFA-e podložne oksidaciji. Antiaterogeni učinak prehrane bogate ribom, odnosno ribljim uljem, pripisan je takozvanim F-kiselinama vrlo sličnim ω-3 PUFA-i, prisutnim i u drugim morskim plodovima, te u biljkama<sup>27</sup>.

U aterosklerozi, primijećena je također povećana količina izoprostana<sup>43,44</sup>. Imunohistokemijskom analizom fibrokalcificiranih plakova, određena je prisutnost velikih količina 8-izo-PF<sub>2α</sub> kao i iPF<sub>2α</sub>-I. Dok nedostatak apoproteina E u miševa dovodi do aterogeneze i do povećanja koncentracije 8-izo-PF<sub>2α</sub> u plazmi, suplementacija folnom kiselinom, vitaminom koji ima pozitivan utjecaj na funkciju endotela, uzrokuje smanjenje koncentracije izoprostana<sup>45</sup>. Eksperimentalnim istraživanjima pokazano je da dok suplementacija vitaminom E nema utjecaja na smanjenje razine kolesterola u plazmi, istodobno dolazi do smanjenja aterosklerotičnih oštećenja i količine iPF<sub>2α</sub>-VI u arterijskome zidu. Ti podaci podupiru pretpostavku o utjecaju povećana oksidacijskoga stresa na razvoj ateroskleroze kao i prevencije lipidne peroksidacije i ateroskleroze oralnom suplementacijom antioksidansima, primjerice vitaminom E.

## ANTIOKSIDANSI KAO POKAZATELJI OKSIDATIVNOGA STRESA

Antioksidansi su definirani kao tvari koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidabilnim supstratima, dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata. Djelovanje antioksidansa može se opisati sljedećim mehanizmima:

- uklanjanjem kisika, ili utjecanjem na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika
- uklanjanjem metalnih iona

Tablica 3. Unutarstanični antioksidacijski enzimi  
Table 3 *Intracellular antioxidant enzymes*

Unutarstanični antioksidansi	
superoksid dismutaze	katalitički uklanjaju $O_2 \bullet^-$
katalaza	uklanja $H_2O_2$ kada je prisutan u velikim koncentracijama
glutation peroksidaze	uklanjaju $H_2O_2$ kada je prisutan u malim koncentracijama; također uklanjaju organske hidroperokside
citokrom oksidaze	priječe oslobađanje aktivnih kisikovih spojeva tijekom redukcije $O_2$ u $H_2O$

- uklanjanjem ciljnih ROS-a kao superoksida ili vodikova peroksida
- uklanjanjem slobodnih radikala
- uklanjanjem singletnoga kisika

#### Unutarstanični antioksidansi

Stanice imaju učinkovitu obranu protiv oksidacijskih oštećenja, a antioksidacijska zaštita može djelovati na nekoliko razina u stanici, i to:

- sprečavanjem nastanka slobodnih radikala
- neutralizacijom nastalih radikala
- popravkom oštećenja nastalih djelovanjem radikala
- povećanim uklanjanjem oštećenih molekula
- priječenjem popravka oštećenih molekula

Kisik se metabolizira unutar stanica gdje antioksidansi djeluju specifično i selektivno (enzimatski) s reduciranim kisikovim međuproduktima<sup>46</sup>. Dok superoksid dismutaza sudjeluje u dismutaciji superoksida u vodikov peroksid, do njegova uništavanja može doći katalazom ili glutathion peroksidazom (tablica 3.). Superoksid dismutaza pripada skupini metaloenzima, a u ljudi postoje tri vrste superoksid dismutaze: citosolna dismutaza CuZnSOD, mitohondrijska dismutaza MnSOD, te izvanstanična dismutaza EC-SOD.<sup>47</sup> Dok je GPx poglavito citosolni enzim, u mitohondrijima se nalazi približno 10% toga enzima. U sisavaca postoji najmanje 5 GPx izoenzima<sup>4</sup>.

Nekontrolirana proizvodnja ROS-a važna je u patogenezi mnogih kliničkih poremećaja, što se očituje promijenjenim aktivnostima superoksid dismutaze, katalaze ili glutathion peroksidaze (tablica 4.).

Tablica 4. Promijenjena aktivnost antioksidacijskih enzima u patološkim stanjima  
Table 4 *Enzyme antioxidant activity changes in pathological conditions*

Vrsta poremećaja	Ključni enzim
preosjetljivost na lijekove	GPx, SOD
preosjetljivost na određene namirnice	GPx
leukemija, tumori bubrega, jetre, crijeva, dojke i kože	CAT, GPx, SOD
ishemija	SOD
ateroskleroza	SOD
<i>Helicobacter pylori</i>	SOD
hepatitis	GPx
gripa	CAT, GPx, SOD
kronična granulomatozna bolest	CAT
Downov sindrom	SOD
dijabetes	CAT, SOD
Alzheimerova bolest	SOD
amiotrofna lateralna skleroza	SOD
Huntingtonova bolest	SOD
Parkinsonova bolest	GPx
očna mreža	CAT, SOD

SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, GPx – glutathion peroksidaza



*Membranski antioksidansi*

Lipofilni radikali koji nastaju u unutrašnjosti membrana, zahtijevaju prisutnost drukčijih vrsta antioksidansa (tablica 5.). Membranski antioksidansi svojim se lipofilnim dijelovima integriraju u membranske sustave, djelujući u njima lokalno.

Vitamin E reagira s peroksilnim radikalima brže nego što oni uspiju reagirati s nezasićenim masnim kiselinama i proteinima. U plazmi, vitamin E štiti lipoproteine od oksidacije. Antioksidacijski učinak  $\beta$ -karotena *in vivo*, manje je izražen<sup>4</sup>.

Tablica 5. Membranski antioksidansi  
Table 5 Membrane antioxidants

Membranski antioksidansi	
vitamin E	antioksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanaca
$\beta$ -karoten	ima sposobnost uklanjanja singletnoga kisika i slobodnih radikala
koenzim Q	ima antioksidacijsko djelovanje u respiratornome lancu

*Izvanstanični antioksidansi*

Osnovna zadaća izvanstaničnih antioksidansa jest zadržavanje željeza i bakra u nereaktivnim oblicima, te sprečavanje mogućega međudjelovanja s vodikovim peroksidom i superoksidnim radikalom (tablica 6.). Također, važno je istaknuti da u izvanstaničnoj tekućini nema navedenih unutarstaničnih enzima, iako je dokazana prisutnost glikoliziranih oblika glutation peroksidaze i superoksid dismutaze<sup>48</sup>.

Trećina željeza u organizmu vezana je uz transferrin, čime se priječi njegovo taloženje i reakcija s

ROS-om u obliku željezo-stimulirajućih reakcija. Mioglobin, hemoglobin, te spojevi koji posjeduju hemska željezo, imaju sposobnost ubrzanja lipidne peroksidacije, no plazma ipak sadrži proteine poput hemopleksina i haptoglobina koji vežu hemoglobin i hemska željezo, te neutraliziraju moguću indukciju lipidne peroksidacije<sup>49,50</sup>. Ceruloplazmin također ima zadaću uklanjanja željeznih iona iz plazme uz istodobnu redukciju kisika u vodu, a reagira i sa superoksidnim radikalom i s vodikovim peroksidom<sup>51</sup>.

Tablica 6. Izvanstanični antioksidansi  
Table 6 Extracellular antioxidants

Izvanstanični antioksidansi	
transferrin	veže ione željeza
laktoferin	veže željezo pri nižim vrijednostima pH-a
haptoglobin	veže hemoglobin
hemopleksin	veže hem
albumin	veže bakar, hem i uklanja HOCl
ceruloplazmin	veže ione bakra, koristi vodikov peroksid za reoksidaciju bakra
EC-SOD	katalitički uklanja superoksidni anion
EC-GSHPx	katalitički uklanja hidroperokside
bilirubin	uklanja peroksilne radikale
urati	uklanjaju radikale i vežu metale
glukoza	uklanja OH <sup>*</sup>

Tablica 7. Niskomolekularni endogeni i nutritivni hidrofilni antioksidansi  
 Table 7 *Low-molecular endogene and nutritive hydrophylic antioxidants*

Antioksidansi	
glutation	uklanja radikale, koristi se za konjugaciju, za regeneraciju askorbata, te kao koenzim
vitamin C	uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivan askorbilni radikal
polifenoli	uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne ione
bilirubin	uklanja peroksilne radikale
urati	uklanjaju radikale i vežu metalne ione
glukoza	uklanja hidroksilne radikale
selen	koenzim glutation peroksidaza

## ZAKLJUČAK

1. Slobodni radikali posljedica su biokemijskih procesa uobičajenih u organizmu.
2. Povećano stvaranje slobodnih radikala uzrokovano nepravilnom prehranom, odnosno patološkim procesima, uzrokuje pojačano oštećenje bioloških makromolekula.
3. Lipidna peroksidacija dovodi do razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina, narušavanja cjelovitosti stanične membrane, te naknadna oštećenja bioloških makromolekula produktima peroksidacije.
4. Povećana lipidna peroksidacija povećava rizik za razvoj ateroskleroze i drugih patoloških stanja.
5. Izravnom reakcijom sa slobodnim radikalima, odnosno uklanjanjem željeznih iona, antioksidansi štite lipidne molekule od oksidacijskoga oštećenja.

## LITERATURA

1. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;4:D339-45.
2. Curnutte JT, Babior BM. Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet* 1987;16:229-45.
3. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108(8):652-9.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford University Press 1999:140-84.
5. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:342-4.
6. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of the reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181-9.
7. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995;18:125-6.
8. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, Skubitz AP, Furcht LT, Low WC. Laminin peptide ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17(6):605-11.
9. Welch KD, Davis TZ, Aust SD. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys* 2002;397(2):360-9.
10. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8(1):95-108.
11. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* 1896;65:899-910.
12. Domitrović R, Tota M, Milin Č. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res* 2006;113(2):177-91.
13. Fischer JG, Glauert HP, Yin T, Sweeney-Reeves ML, Larmonier N, i sur. Moderate iron overload enhances lipid peroxidation in livers of rats, but does not affect NF-kappaB activation induced by the peroxisome proliferator, Wy-14,643. *J Nutr* 2002;132(9):2525-31.
14. Premkumar K, Bowlus CL. Ascorbic acid does not increase the oxidative stress induced by dietary iron in C3H mice. *J Nutr* 134(2):435-8.
15. Gavino VC, Dillard CJ, Tappel AL. The effect of iron overload on urinary excretion of immunoreactive prostaglandin E2. *Arch Biochem Biophys* 1985;237(2):322-7.
16. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91(3C):14S-22S.
17. Pizato N, Bonatto S, Yamazaki RK, Aikawa J, Nogata C, Mund RC, i sur. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Nutr Cancer* 2005;53(2):194-201.

18. Leonarduzzi G, Chiarotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005;49(11):1044-9.
19. Yang K, Fang J, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. *Mutat Res* 1998; 422 (2):285-95.
20. el Ghissassi F, Barbin A, Nair J, Bartsch H. Formation of 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem Res Toxicol* 1995;8(2):278-83.
21. Moore K. Isoprostanes and the liver. *Chem Phys Lipids* 2004;128(1- 2):125-33.
22. Vacchiano CA, Tempel GE. Role of nonenzymatically generated prostanoid, 8-iso-PGF<sub>2</sub> alpha, in pulmonary oxygen toxicity. *J Appl Physiol* 1994;77(6):2912-7.
23. Gao L, Yin H, Milne GL, Porter NA, Morrow JD. Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* 2006;281(20):14092-9.
24. Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. *Biomarkers* 2005;10(Suppl 1):S24-9.
25. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes. A compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993;19:141-58
26. Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:355-66.
27. Burch JW, Burch PT. Glutathione disulfide production during arachidonic acid oxygenation in human platelets. *Prostaglandins* 1990;39:123-34.
28. Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, i sur. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 2002;100:917-24.
29. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-5.
30. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest* 1977;59:959-65.
31. Stuart MJ, Holmsen H. Hydrogen peroxide, an inhibitor of platelet function: effect on adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *Am J Hematol* 1977;2:53-63.
32. Rodvien R, Lindon JN, Levine P. Physiology and ultrastructure of the blood platelet following exposure to hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1976;33:19-24.
33. Irani K, Pham Y, Coleman LD, Roos C, Cooke GE, Miodovnik A, i sur. Priming of platelet  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of  $\beta$ 3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1698-706.
34. Brooks CJW, Harland WA, Steel G, Gilbert JD. Lipids of human atheroma: isolation of hydroxyoctadecadienoic acids from advanced aortal lesions. *Biochim Biophys Acta* 1970;202:563-6.
35. Harland WA, Gilbert JD, Brooks CJW. Lipids of human atheroma. VIII. Oxidised derivatives of cholesteryl linoleate. *Biochim Biophys Acta* 1973;316: 378-85.
36. Kühn H, Belkner J, Wiesner R, Schewe T, Lankin VZ, Tikhaze AK. Structure elucidation of oxygenated lipids in human atherosclerotic lesions. *Eicosanoids* 1992;5:17-22.
37. Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1616-24.
38. Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J, Jeong T, Camejo EH, Najib J, i sur. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* 1998;273:2738-46.
39. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site of macrophages of acetylated low density lipoproteins producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:333-7.
40. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that incrinse the atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
41. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heartdisease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991;53 (Suppl):326-34.
42. Gey KF, Puska P. Plasma vitamin E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:268-82.
43. Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Kuhn H. Prostaglandin F<sub>2</sub> like compounds, F<sub>2</sub> isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3236-41.
44. Habib A, Badr KF. Molecular pharmacology of isoprostanes in vascular smooth muscle. *Chem Phys Lipids* 2004;128:69-73.
45. Carnicer R, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, Acín S, Guzmán MA, Surra JC, i sur. Folic acid supplementation delays atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *Life Sci* 2007;80(7):638-43.
46. Gutteridge JMC, Halliwell B. The antioxidant problems of extracellular fluids. In: Chrow CK, ed. Cellular antioxidant defense mechanisms, Vol 2. Boca Ration, CRC Press 1988:1-23
47. Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub>-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997;272(30):18515-7.
48. Markklaud SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982;125:41-51.
49. Gutteridge JMC. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1987;917:219-23.
50. Gutteridge JMC, Smith A. Antioxidant protection by heamopexin of heam-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J* 1988;256:861-85.
51. Bannister JV, Bannister WH, Hill HAO, Mahood JF, Willson RL, Wolfenden BS. Does caeruloplasmin dismutate superoxide? No. *FEBS Lett* 1980;118:127-9.